

506/508

Rec'd PCT/PTO 01 SEP 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 9 月 12 日 (12.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/074702 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 5/10, A61K 38/17, 39/395, G01N 33/50, 33/15, C12Q 1/68, C12P 21/02, 21/08 // (C12N 15/12, C12R 1:19) (C12N 5/10, C12R 1:91) (C12P 21/02, C12R 1:91) (C12P 21/08, C12R 1:91)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02564
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 5 日 (05.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-61133 2002 年 3 月 6 日 (06.03.2002) JP  
特願2002-98852 2002 年 4 月 1 日 (01.04.2002) JP  
特願2002-184883 2002 年 6 月 25 日 (25.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中西 淳 (NAKANISHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒305-0025 茨城県 つくば市 花室 1 5 5 7-1 1 Ibaraki (JP). 引地 由紀子 (HIKICHI, Yukiko) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つくば市 松代 4 丁目 2 1 番地 2-1-5 0 4 号 Ibaraki (JP). 宇野 裕美子 (UNO, Yumiko) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城
- (74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびその DNA

(57) Abstract: A novel protein having an activity of transporting an organic anion which is useful as, for example, a diagnostic marker for kidney diseases, liver diseases, pancreas diseases, immunological diseases associating thymus failures, reproductive diseases, digestive diseases, spleen diseases, cancer, respiratory diseases, myelitis, diabetes, hypertension, reperfusion injury following ischemia, retinitis, central nervous diseases, skin diseases, thyroid hormone-associated diseases, etc. Compounds promoting or inhibiting the activity of the above protein, which are obtained by a screening method with the use of the protein, are usable as, for example, preventives/remedies for the above-described diseases.

(57) 要約: 本発明の有機アニオン輸送活性を有する新規タンパク質は、例えば腎疾患、肝臓疾患、膵臓疾患、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患、消化器性疾患、脾臓疾患、癌、呼吸器疾患、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患、皮膚疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質を用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、例えば、上記疾患などの予防・治療剤として使用することができる。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/074702 A1

## 明 細 書

## 新規タンパク質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、新規な有機アニオントランスポーター (oatp/LST) タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

10

## 背景技術

有機アニオントランスポーターであるoatp/LST遺伝子群 (SLC21ファミリー) はナトリウム非依存性のトランスポーターであり、生体内において血液脳関門を介した甲状腺ホルモン類の中樞神経系への取り込み、血液からの胆汁酸や薬物の肝臓への移行、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの炎症性メディエーターの除去、異物の胆汁や尿中への排出などの生体の恒常性維持に欠かせない役割を果たしている事が知られている。現在までにoatp/LST群はヒトでは13種類 (例、SLC21A3、SLC21A6、SLC21A11、SLC21A12 (Biochemical and Biophysical Research Communications、273巻、251頁、2000年) など)、ラットでは10種類 (例、Slc21a1、Slc21a5など) の報告があり、発現分布は脳特異的、肝臓特異的、広範囲に発現しているものの3種におおよそ分類される。

20

有機アニオントランスポーターは、基質として胆汁酸のみならず、甲状腺ホルモンや抱合型ステロイドなどの生理活性物質を輸送する。これらの基質の多くは核内レセプターのリガンドであることから、有機アニオントランスポーターは核内レセプターのリガンドを細胞内に最初に取り込むという重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、その詳細なメカニズムはよく分かっていない。よって、これらのトランスポーターの役割を解明することが種々の疾患に対する治療薬開発につながると考えられる。

25

## 発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、新規な有機アニオントランスポータータンパク質を見出した。該タンパク質を抑制する方法としては、例えば、有機アニオンの輸送を阻害したり、該タンパク質の転写を抑制して発現レベルを低下させることが考えられる。該タンパク質を賦活化する方法としては、例えば有機アニオンの輸送を促進したり、該タンパク質のプロモーターを活性化したり、mRNAを安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1、配列番号：26または配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(3) 配列番号：26で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(4) 配列番号：52で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(5) 配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列である上記(1)記載のタンパク質またはその塩、

(6) 配列番号：54で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(7) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(8) 上記(1)記載のタンパク質または上記(7)記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(9) DNAである上記(8)記載のポリヌクレオチド、

(10) 配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：5

5 で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(1 1) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(1 2) 上記(1 1)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

5 (1 3) 上記(1 2)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質または上記(7)記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取すること  
を特徴とする上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

(1 4) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

10 (1 5) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(1 6) 上記(8)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(1 7) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(1 8) 上記(1 7)記載の抗体を含有してなる診断薬、

15 (1 9) 上記(1 7)記載の抗体を含有してなる医薬、

(2 0) 上記(8)記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(2 1) 上記(2 0)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(2 2) 上記(2 0)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

20 (2 3) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質もしくは  
上記(7)記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物  
またはその塩のスクリーニング方法、

(2 4) 上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)記載の部分ペプチド  
25 またはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質もしくは上記(7)  
記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその  
塩のスクリーニング用キット、

(2 5) 上記(2 3)記載のスクリーニング方法または上記(2 4)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質もしくは

上記（７）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、

（２５ａ） 上記（１）記載のタンパク質もしくは上記（７）記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、

5 （２６） 上記（２５）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２６ａ） 上記（２５ａ）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２７） 上記（８）記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 （２８） 上記（８）記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（２９） 上記（２７）記載のスクリーニング方法または上記（２８）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

15 （２９ａ） 上記（１）記載のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、

（３０） 上記（２９）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（３０ａ） 上記（２９ａ）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

20 （３１） 上記（１７）記載の抗体を用いることを特徴とする上記（１）記載のタンパク質の定量方法、

（３２） 上記（３１）記載の定量方法を用いることを特徴とする上記（１）記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法、

25 （３３） 上記（１７）記載の抗体を用いることを特徴とする、上記（１）記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３４） 上記（１７）記載の抗体を含有してなる、上記（１）記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（３５） 上記（３３）記載のスクリーニング方法または上記（３４）記載のス

クリーニング用キットを用いて得られる、上記（１）記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩、

（３５ａ） 上記（１）記載のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩、

（３６） 上記（３５）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

5 （３６ａ） 上記（３５ａ）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（３７） 腎疾患の予防・治療剤である上記（１４）、（１５）、（１９）、（２２）、（２６）、（３０）または（３６）記載の医薬、

（３７ａ） 腎疾患の予防・治療剤である上記（２６ａ）、（３０ａ）または（３６ａ）記載の医薬、

10 （３７ｂ） 腎疾患が糖尿病性腎症である上記（３７）または（３７ａ）記載の医薬、

（３７ｃ） 甲状腺ホルモン関連疾患の予防・治療剤である上記（１４）、（１５）、（１９）、（２２）、（２６）、（３０）または（３６）記載の医薬、

15 （３７ｄ） 甲状腺ホルモン関連疾患の予防・治療剤である上記（２６ａ）、（３０ａ）または（３６ａ）記載の医薬、

（３７ｅ） 甲状腺ホルモン関連疾患が甲状腺ホルモン不応症である上記（３７ｃ）または（３７ｄ）記載の医薬、

（３８） 哺乳動物に対して、上記（２５）、（２９）または（３５）記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする腎疾患の予防・治療方法、

20 （３９） 腎疾患の予防・治療剤を製造するための上記（２５）、（２９）または（３５）記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。

#### 図面の簡単な説明

25 図１は、ヒトTCH229、ヒトSLC21A12およびヒトOATPRP4のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、SLC21A12はヒトSLC21A12のアミノ酸配列を、OATPRP4はヒトOATPRP4のアミノ酸配列を、TM1～TM12は膜貫通領域を示す。□は、ヒトTCH229に一致するアミノ酸を示す。（図２へつづく）

図２は、ヒトTCH229、ヒトSLC21A12およびヒトOATPRP4のアミノ酸配列の比較

を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、SLC21A12はヒトSLC21A12のアミノ酸配列を、OATPRP4はヒトOATPRP4のアミノ酸配列を、TM1～TM12は膜貫通領域を示す。□は、ヒトTCH229に一致するアミノ酸を示す。(図1のつづき)

- 5 図3は、ヒトTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図4は、ヒトTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図5は、ヒトTCH229およびマウスTCH229のアミノ酸配列の比較を表す図である。

- 10 図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、mTCH229はマウスTCH229のアミノ酸配列を、膜貫通領域はTM1～12、ファミリー間で高く保存されているアミノ酸箇所は\*で示した。□は、両者に一致するアミノ酸を示す。

図6は、マウスTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

- 15 図7は、ヒトTCH229とラットTCH229No.1およびNo.2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、rTCH229No.1はラットTCH229No.1のアミノ酸配列を、rTCH229No.2はラットTCH229No.2のアミノ酸配列を示す。TM1～TM12は膜貫通領域を示す。□は、3者に一致するアミノ酸を示す。(図8へつづく)

- 20 図8は、ヒトTCH229とラットTCH229No.1およびNo.2のアミノ酸配列の比較を表す図である。図中、TCH229はヒトTCH229のアミノ酸配列を、rTCH229No.1はラットTCH229No.1のアミノ酸配列を、rTCH229No.2はラットTCH229No.2のアミノ酸配列を示す。TM1～TM12は膜貫通領域を示す。□は、3者に一致するアミノ酸を示す。(図7のつづき)

- 25 図9は、ラットTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量はcDNA溶液1 $\mu$ l当たりのコピー数で表した。

図10は、マウスTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、cDNA溶液1 $\mu$ l当たりのマウスTCH229のコピー数を、等量の各組織cDNAにおけるrodent GAPDHのコピー数で割った値で表した。

図 1 1 は、ラットTCH229遺伝子産物の各組織における発現量を表す図である。発現量は、相対的発現量を100倍した値で表した。

図 1 2 は、ヒト正常細胞におけるヒトTCH229の発現変動を表す図である。図中、縦軸は、ヒトTCH229遺伝子発現値のヒト18S発現値に対する相対的発現値を  
5 100000倍した値を示す。横軸は細胞名を示す。■はTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  およびIL-6  
(各々10ng/ml) 刺激無し、□はTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  およびIL-6 (各々10ng/ml) 刺激  
有りを示す。

図 1 3 は、刺激剤で刺激したRPTECにおけるヒトTCH229の発現変動を表す図である。図中、縦軸は、ヒトTCH229遺伝子発現値のヒトGAPDH発現値に対する相対  
10 的発現値を100倍した値を示す。横軸は刺激剤での反応時間を示す。—●—は  
TGF- $\beta$ 1、—■—はPMA、—▲—はTNF- $\alpha$ 、—\*—はIL-1 $\beta$ 、—○—はIL-6、—△  
—はコントロールを示す。

図 1 4 は、刺激剤で刺激したHRCEにおけるヒトTCH229の発現変動を表す図である。図中、縦軸は、ヒトTCH229遺伝子発現値のヒトGAPDH発現値に対する相対的  
15 発現値を100倍した値を示す。横軸は刺激剤での反応時間を示す。—●—はTGF-  
 $\beta$ 1、—■—はPMA、—▲—はTNF- $\alpha$ 、—\*—はIL-1 $\beta$ 、—○—はIL-6、—△—は  
コントロールを示す。

図 1 5 は、ラットTCH229遺伝子発現量を表す図である。図中、縦軸はラット  
TCH229遺伝子発現値のrodent GAPDH発現値に対する相対的発現値を1000倍した値  
20 を、横軸は腎臓を採取した週齢を示す。□は実験群 (WFラット)、■は対照群  
(WLラット) の結果である。

図 1 6 は、ラットTCH229遺伝子発現量を表す図である。図中、縦軸はラット  
TCH229遺伝子発現値のrodent GAPDH発現値に対する相対的発現値を1000倍した値  
を、横軸は腎臓を採取した週齢を示す。□は実験群 (SHCラット)、■は対照群  
25 (SDラット) の結果である。

図 1 7 は、ラットTCH229遺伝子発現量を表す図である。図中、縦軸はラット  
TCH229遺伝子発現値のrodent GAPDH発現値に対する相対的発現値を1000倍した値  
を、横軸は腎臓を採取した週齢を示す。□は実験群 (ZFラット)、■は対照群  
(ZLラット) の結果である。



### 発明を実施するための最良の形態

配列番号：1、配列番号：26または配列番号：52で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：26で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約6

0%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

5 配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

10 配列番号：52で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：52で表されるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

15 配列番号：52で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：52で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。配列番号：52で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有する  
20 タンパク質などが挙げられる。

実質的に同質の活性としては、例えば、有機アニオンの輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、有機アニオンの輸送活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

25

有機アニオンとしては、例えばグルクロン酸、グルタチオン、コール酸などの胆汁酸、甲状腺ホルモンなどが挙げられる。

有機アニオンの輸送活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことが

でき、例えば、Biochemical and Biophysical Research Communications、第273巻、251頁、2000年に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

- また、本発明のタンパク質としては、例えば、
- 5 (1) (i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数
- 10 (1～5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1
- 15 ～5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1
- 20 ～5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1
- 25 ～5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、
- (2) (i) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配

- 列、(iii) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：26で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、

- (3) (i) 配列番号：52で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：52で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：52で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：52で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～200個程度、好ましくは1～150個程度、好ましくは1～100個程度、好ましくは1～50個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、

欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイルなどの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの $\text{C}_{1-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の

部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち例えば10個以上、好ましくは20個以上、好ましくは50個以上、好ましくは70個以上、好ましくは100個以上、好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、例えば第340番目～370番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：26で表されるアミノ酸配列において、例えば第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：52で表されるアミノ酸配列において、例えば第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：54で表されるアミノ酸配列において、例えば第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列などを含有するペプチドなどが好ましい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであつてもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保

護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- 5      本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば、第340番目～370番目、第490番目～520のアミノ酸配列、配列番号：26で表されるアミノ酸配列において例えば、第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：52で表されるアミノ酸配列において例えば、第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列、配列番号：54で表されるアミノ酸配列において例えば、第335番目～365番目、第490番目～520番目のアミノ酸配列などを含有するペプチドが好ましい。

- 15      本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属等）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 20      本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

25      ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT, HOOBT）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸



エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いた

5 テストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

10 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

15 カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジル

20 エステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低

25 級（ $\text{C}_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-

Bz 1、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 5 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。
- 10 アミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1-2-エタンジチオールなどのようなりガンド作動性カチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1-2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸
- 15
- 20
- 25 処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の

(a) ~ (e) に記載された方法が挙げられる。

(a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 I V、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

10 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

15 ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

20 本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば (i) 配列番号：2 で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(ii) 配列番号：25 で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：25 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(iii) 配列番号：27 で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：27 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下

25

- でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(iv) 配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：51で表される塩基配列とハイストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(v) 配列番号：53で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：53で表される塩基配列とハイストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(vi) 配列番号：80で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：80で表される塩基配列とハイストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(vii) 配列番号：55で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：55で表される塩基配列とハイストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、(viii) 配列番号：81で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：81で表される塩基配列とハイストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列とハイストリンジेंटな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：27または配列番号：51で表される塩基配列とハイストリンジエ

5      ントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：27  
または配列番号：51で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%  
以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%  
以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有  
する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

10      配列番号：53または配列番号：80で表される塩基配列とハイストリンジェ  
ントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：53  
または配列番号：80で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%  
以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%  
以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有  
する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

15      配列番号：55または配列番号：81で表される塩基配列とハイストリンジェ  
ントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：55  
または配列番号：81で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%  
以上、好ましくは約70%以上、好ましくは約80%以上、好ましくは約90%  
以上、より好ましくは約95%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有  
する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

20      ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、  
モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al.,  
Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうこと  
ができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載  
の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな  
条件に従って行なうことができる。

25      ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40m  
M、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60  
~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の  
場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質  
をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDN

- A、配列番号：25で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：53で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：80で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：54で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：55で表される塩基配列を含有するDNA、配列番号：81で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。
- 10 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。
- 15 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
- （1）配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2または配列番号：25で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、（2）配列番号：27で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：27で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、（3）配列番号：53で表される塩基配列を有するDNAの一部分を含有するDNA、または配列番号：53で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、（4）配列番号：55で表される塩基配列を有するDNAの一部分を含有するDNA、または配列番号：55で表される塩基配列とハイストリン
- 20
- 25

ジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部を含有するDNAなどが用いられる。

5 配列番号：2、配列番号：25、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

10 本発明のタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは  
15 合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って  
20 行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

25 クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプ



ターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19, pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺

伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて dhfr 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

- 5      また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

- 15      宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)] , JM103 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , JA221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C600 [Genetics, 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

- 20      バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) M114 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

- 25      酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO(dhfr)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69巻, 2110(1972)やGene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に

調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃ で約 3～5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5～20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122 巻, 501 (1952)] , DME  
5 M 培地 [Virology, 8 巻, 396 (1959)] , RPMI 1640 培地 [The Journal of  
the American Medical Association 199 巻, 519 (1967)] , 199 培地

[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73 巻, 1 (1950)]  
などが用いられる。pH は約 6～8 であるのが好ましい。培養は通常約 30～40℃ で約 15～60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、  
15 公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、  
リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したの  
ち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられ  
る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-1  
00™ などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌さ  
20 れる場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、  
上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の  
精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これら  
の公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、  
25 透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気  
泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー  
などの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特  
異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差  
を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用い

られる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロットティングなどにより測定することができる。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、

例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔Nature、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

10 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1な  
 どの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用  
 いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1  
 ～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）  
 が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃  
 15 で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

25 モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培

地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、  
5 上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### （b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。  
10

#### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

15 本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

20 温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアー蛋白質とハプテンとの混合比は、キャリアー蛋白質に架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。  
25

また、ハプテンとキャリアー蛋白質のカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。



縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

- 5      ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

10

本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のDNA

15      の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

20

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。

25

具体的には、配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレ

オチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

- 5        アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

10

本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできる該遺伝子に対応するアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とタンパク質との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される（指令にある）タンパク質のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'

15

20

25

端パリンドローム領域または3'端ヘアピンループなどは、好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

- 目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであってもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-ラーリジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつような

ものを含んでいて良い。このような修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、  
5 脂肪族基などで置換されていたり、またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシ  
10 ドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセンスポリヌクレオチ  
15 ドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えばPharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年、Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊  
20 な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリ  
25 しい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌ

クレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

- 5      アンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、または本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

- 10      以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えばDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

- 15      本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、有機アニオンの輸送活性を抑制することで、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレ
- 20
- 25

- チン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。一方、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば、
- 5 有機アニオンの輸送活性を促進することで、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾
- 10 患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、
- 15 網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤として使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ま
- 20 しくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

#### 〔1〕本発明のタンパク質が関与する各種疾病の予防・治療剤

- 本発明のタンパク質は、有機アニオンの輸送活性などを有し、生体内において血液脳関門を介した甲状腺ホルモン類の中枢神経系への取り込み、血液から胆汁
- 25 酸または薬物の肝臓への移行、プリスタグランジンまたはロイコトリエンなどの炎症メディエーターの除去、異物の胆汁または尿中への排出など、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。

したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例

- 例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの種々の疾患が発症する。
- したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの

予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、有機アニオンの輸送活性が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または（ハ）本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

10 本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

20 本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル



ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料に

5 さらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

- 10 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆
- 15 油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配
- 20 合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

- このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、
- 25 ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該タンパク質

を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、腎不全の治療目的で本発明のタンパク質を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質を約  
5 0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり  
に換算した量を投与することができる。

## 〔2〕 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

10 本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、（1）本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、有機アニオンの輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、  
15

（2）（i）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の有機アニオンの輸送活性と（ii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の有機アニオンの輸送活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

20 具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、（i）と（ii）の場合において、有機アニオンの輸送活性を蛍光色素で測定し、有機アニオンの輸送活性の指標として比較することを特徴とするものである。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。  
25

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、

ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

5 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

10 本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性は、公知の方法、例えば、Biochemical and Biophysical Research Communications、第273巻、251頁、2000年に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

15 例えば、上記(ii)の場合における有機アニオンの輸送活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

また、例えば、上記(ii)の場合における有機アニオンの輸送活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

20 また、本発明のタンパク質遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、上記の各種細胞に発現させ、該細胞に上記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

25 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、(3) 本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いる

ことを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

- （４）（iii）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合  
5 と（iv）本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

- 上記スクリーニング方法においては、例えば、（iii）と（iv）の場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量）を測定して、比較する。  
10

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 15 上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

- 20 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。  
25

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

本発明のタンパク質遺伝子の発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム (ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction) などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現を、上記 (iii) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現を、上記 (iii) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

本発明は、(5) 本発明の抗体を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の発現 (産生) を促進または阻害する化合物またはその塩 (以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある) のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

(6) (v) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と (vi) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物を培養した場合との比較を行うことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法においては、例えば、本発明の抗体を用いて (v) と (vi) の場合における、本発明のタンパク質の発現量 (具体的には、本発明のタンパク質量) を測定 (例、本発明の蛋白質の発現を検出、本発明の蛋白質の発現量を定量等) して、比較する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げ

られ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッ  
5      ファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、  
ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の有機アニオンの輸送活性を阻害  
しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した  
本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿  
10     主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物  
細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養  
することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好  
ましく用いられる。

本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を  
15     認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェス  
タン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定すること  
ができる。

例えば、上記（vi）の場合における本発明のタンパク質の発現を、上記（v）  
の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約5  
20     0%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を促進する化合物また  
はその塩として選択することができる。

例えば、上記（vi）の場合における本発明のタンパク質の発現を、上記（v）  
の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約5  
0%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物また  
25     はその塩として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチ  
ドまたはその塩、または本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能  
力を有する細胞を含有するものである。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる

化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、有機アニオンの輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巢囊腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸

炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

また、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、例



- 例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

- 本発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、膵臓疾患（例、膵炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセ

ドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などなどの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

- 5       また、本発明のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、
- 10       消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高
- 15       血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・
- 20       治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

- 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩としては、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩、本発明のタンパク質遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩、本
- 25       発明のタンパク質の発現を促進する化合物またはその塩が好ましい。

      本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

- 5      該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、腎不全治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。
- 10
- 15

### 〔3〕本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

- 本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。
- 20

すなわち、本発明は、

- （i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および
- 25      （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体であ

ることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、あるいは $Fab$ 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{32}P]$ 、 $[^{33}P]$ 、 $[^{35}S]$ など）、蛍光物質〔例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど〕、酵素（例、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）、ビオチン、ランタニド元素などが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反

応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、

5    また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク

10    質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、

15    競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

20   

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

25   

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降

物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、  
5 操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、  
入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治  
10 ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical  
15 Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）などを参照することができる。

20 以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候  
25 群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、

- 腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などが発症している可能性が高いと診断することができる。反対に、例えば、本発明のタンパク質の濃度の上昇が検出された場合、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などが発症している可能性が高いと診断することが出来る。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### 〔４〕遺伝子診断薬

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874~879頁(1989)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766~2770頁(1989)）などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現増加が検出された場合、例えば腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などである可能性が高いと診断することが出来る。反対に、発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、ア



- ルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などである可能性が高いと診断することができる。

〔5〕 アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬および診断薬

- 15 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能（例、有機アニオンの輸送活性）を抑制することができるので、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾

- 患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、上記疾患の診断にも用いられる。
- 5

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

- 例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。
- 10
- 15

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、腎不全の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを腎臓に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。

- さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。
- 20

さらに、本発明は、

- (i) 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部とそれに相補的なRNAを含有する二重鎖RNA、
- 25
- (ii) 前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
- (iii) 本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
- (iv) 前記リボザイムを含有してなる医薬、
- (v) 前記リボザイムをコードする遺伝子（DNA）を含有する発現ベクターな

ども提供する。

- 上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、二重鎖RNA、リボザイムなども、本発明のDNAから転写されるRNAを破壊またはその機能を抑制することができ、生体内における本発明のタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

- リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、公知のリボザイムの配列の一部を本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に置換することによって製造することができる。本発明のタンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得るコンセンサス配列NUX（式中、Nはすべての塩基を、XはG以外の塩基を示す）の近傍の配列などが挙げられる。

上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。また、前記(v)の発現ベクターは、公知の遺伝子治療法などと同様に用い、上記予防・治療剤として使用する。

5

#### 〔6〕本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、関節内投与）に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、糖尿病性腎症の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01

～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

- 5      本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、静脈、関節内投与）に適する剤形として提供される。好ましくは吸入剤として提供される。
- 10      なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

#### 〔7〕本発明のDNAを有する動物の作出

- 15      本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- （1）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
（2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の動物、  
20      （3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記（2）記載の動物、および  
（4）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。

- 25      本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することがで

きる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

- 5 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系統、  
10 B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

- 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA  
15 ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

- 該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味  
20 し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

- 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入するにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA  
25 コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入する場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精

卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテイナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド

鎖延長因子 1  $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ  $\beta$  アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするmRNAの転写を終結する配列（一般にターミネターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを導入した非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境



で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞

の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

5 本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

10 また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを導入した哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはその機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

(i) 組織培養のための細胞源としての使用、

20 (ii) 本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、

(iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

25 (iv) 上記(iii)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べるこ

とができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

5 また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

10 さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### [8] ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

20 すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された上記（1）記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である上記（1）記載の胚幹細胞、
- 25 (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである上記（4）記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDN

- Aに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記（６）記載の非ヒト哺乳動物、  
（８）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（６）記載の非ヒト哺乳動物、  
（９）ゲッ歯動物がマウスである上記（８）記載の非ヒト哺乳動物、および  
（１０）上記（７）記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発  
5 現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進  
または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳  
動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現  
能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性  
10 を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現  
能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト  
哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的  
15 手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させ  
ることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読  
み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することに  
より本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

- 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のD  
20 NA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体  
例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離  
し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子  
を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝  
子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代  
25 表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、  
あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列  
（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なmRNAを合成でき  
なくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を  
有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同

組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知のEvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス(C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期

におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をロックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別する

ことが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

5 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

10 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

20 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

25 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に

変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 5       さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の
- 10       雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

- また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により
- 15       誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

〔8 a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

- 20       本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 25

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、



合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 5 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

- 10 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、腎不全に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の血中クレアチニン量や、尿タンパク質量などを経時的に測定する。

- 15 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 20 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、  
25 蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまた

はその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の腎不全の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の腎不全の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～
- 10 20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当りに換算した量を投与することができる。

〔8 b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

- 本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、
- 15 レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。
- 20

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

- レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β-ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。
- 25

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースする

ことにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド (X-gal) のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

15 上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

20 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

25 本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、腎疾患 (例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など)、

- 肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。
- 15      また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症な
- 20
- 25

ど)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性腎症などの予防・治療剤として使用する。

上記化合物の中で好ましくは、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の腎不全患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の腎不全患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の腎不全患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプ

ロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の腎不全患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たりに換算した量を投与することができる。

- 5      このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

- 10      また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子導入動物）を作出すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での  
15      産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該  
20      分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- |           |               |
|-----------|---------------|
| DNA       | : デオキシリボ核酸    |
| cDNA      | : 相補的デオキシリボ核酸 |
| A         | : アデニン        |
| 25      T | : チミン         |
| G         | : グアニン        |
| C         | : シトシン        |
| RNA       | : リボ核酸        |
| mRNA      | : メッセンジャーリボ核酸 |

	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
5	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
10	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
15	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
20	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
25	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記

する。

	Me	: メチル基
	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
5	Ph	: フェニル基
	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
	Bzl	: ベンジル
10	Cl <sub>2</sub> -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
15	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェニル
	Trt	: トリチル
	Bum	: t-ブトキシメチル
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
20	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1-2, 3-ベンゾトリアジン
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシ イミド
25	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

実施例3で取得したヒトTCH229タンパク質のアミノ酸配列を示す。



〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトTCH229タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

- 5 実施例1、実施例2、実施例5、実施例6、実施例9および実施例10で用いられたプライマーAP1の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

実施例1、実施例3および実施例15で用いられたプライマーrr1の塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：5〕

実施例1、実施例2、実施例5、実施例6、実施例9および実施例10で用いられたプライマーAP2の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

- 15 実施例1、実施例3および実施例15で用いられたプライマーrr2の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

実施例1で用いられたプライマーrr3の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

実施例1で用いられたプライマーrr4の塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：9〕

実施例2実施例3および実施例15で用いられたプライマーff1の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

- 25 実施例2、実施例3および実施例15で用いられたプライマーff2の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

実施例3で用いられたプライマーORFF1の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

実施例3で用いられたプライマーORFR1の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

実施例3で用いられたプライマーORFF2の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

実施例3で用いられたプライマーORFR2の塩基配列を示す。

5 〔配列番号：15〕

実施例3および実施例7で用いられたプライマーM13Fの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

実施例3および実施例7で用いられたプライマーM13Rの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

10 実施例3および実施例15で用いられたプライマーA1の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

実施例3および実施例15で用いられたプライマーB2の塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

15 実施例4、実施例16および実施例17で用いられたプライマーTMFの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例4、実施例16および実施例17で用いられたプライマーTMRの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

20 実施例4、実施例16および実施例17で用いられたTaqManプローブP1の塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕

実施例1で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

25 実施例1で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

実施例2で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

実施例3で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

実施例7で取得したマウスTCH229タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するマウスTCH229タンパク

5 質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

実施例5および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

実施例5および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：30〕

実施例5で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

実施例5および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

15 実施例6および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

実施例6および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：35〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

25 実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：39〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：42〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：44〕

10 実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

実施例8および実施例13で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

実施例8および実施例13で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：47〕

実施例8および実施例13で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

実施例5で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：49〕

20 実施例5で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

実施例6で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：51〕

実施例7で得られた塩基配列を示す。

25 〔配列番号：52〕

実施例11で取得したラットTCH229タンパク質No. 1のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：53〕

配列番号：52で表されるアミノ酸配列を有するラットTCH229タンパク

質No. 1をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

実施例11で取得したラットTCH229タンパク質No. 2のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：55〕

配列番号：54で表されるアミノ酸配列を有するラットTCH229タンパク質No. 2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：57〕

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：58〕

実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

15 実施例9で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：60〕

実施例10で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：61〕

実施例10および実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：62〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：63〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：64〕

25 実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：65〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：66〕

実施例11および実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：67〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：68〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：69〕

実施例11、実施例12、実施例14および実施例18で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：70〕

10 実施例11、実施例12、実施例14および実施例18で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：71〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：72〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：73〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：74〕

実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：75〕

20 実施例11で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：76〕

実施例12、実施例14および実施例18で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：77〕

25 実施例9で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：78〕

実施例9で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：79〕

実施例10で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：80〕

実施例11で得られた塩基配列を示す。

〔配列番号：81〕

実施例11で得られた塩基配列を示す。

5 〔配列番号：82〕

実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：83〕

実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：84〕

10 実施例15で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

後述の実施例3で取得されたエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)

TOP10/pCR-BluntII-TCH229は、2002年3月27日から、日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物  
15 寄託センターに寄託番号FERM BP-7983として、2002年3月12日から、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人 発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16767としてそれぞれ寄託されている。

後述の実施例7で取得されたエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)

TOP10/pCR2.1-mTCH229は、2002年6月13日から、日本国茨城県つくば市東1-1-1  
20 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-8076として、2002年6月4日から、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85（郵便番号532-8686）の財団法人 発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16800として寄託されている。

25 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

#### 実施例1

ヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流端のクローニン

グ

5'RACE PCR クローニングによりヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

- 2種のプライマーDNA、プライマーAP1（配列番号：3）およびプライマーrr1（配列番号：4）を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件で一次PCRを行った。

- (1) 94℃30秒間
- (2) 94℃10秒間－63℃3分間を35サイクル

- 10 さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2（配列番号：5）とプライマーrr2（配列番号：6）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により以下の条件でnested PCRを行った。

- (3) 94℃30秒間
- (4) 94℃10秒間－63℃3分間を30サイクル

- 15 上記nested PCR反応液 5 $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスビ社製）中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1 $\mu$ l加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーAP2（配列番号：5）、プライマーrr2（配列番号：6）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：22に示す塩基配列を得た。

- 25 配列番号：22に示す塩基配列をもとにプライマーrr3（配列番号：7）およびプライマーrr4（配列番号：8）を設計した。プライマーAP1（配列番号：3）およびプライマーrr3（配列番号：7）を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件で一次PCRを行った。

- (5) 94℃30秒間
- (6) 94℃10秒間－63℃2分間を35サイクル



さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2（配列番号：5）とプライマーrr4（配列番号：8）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により以下の条件でnested PCRを行った。

(7) 94℃30秒間

5 (8) 94℃10秒間－63℃2分間を30サイクル

上記nested PCR反応液 5  $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスビ社製）中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Posphataseをそれぞれ1  $\mu$ l加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーAP2（配列番号：5）とプライマーrr4（配列番号：8）およびBigDye Terminator Cycle

10 Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：2 3に示す塩基配列を得た。

## 15 実施例 2

ヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

3'RACE PCR クローニングによりヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流端の塩基配列を明らかにした。

20 2種のプライマーDNA、プライマーAP1（配列番号：3）およびプライマーff1（配列番号：9）を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

25 (2) 94℃10秒間－63℃3分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2（配列番号：5）とプライマーff2（配列番号：10）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94℃30秒間

(4) 94℃10秒間－63℃3分間を30サイクル

上記nested PCR反応液 5 $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエスビ社製) 中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Posphataseをそれぞれ1 $\mu$ l加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーAP2 (配列番号:

- 5 5) とプライマーff2 (配列番号: 10) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、配列番号: 24に示す塩基配列を得た。

10

### 実施例 3

ヒトTCH229タンパク質をコードするcDNAのクローニング

- 2種のプライマーDNA、プライマーORFF1 (配列番号: 11) およびプライマーORFR1 (配列番号: 12) を用いて、ヒト腎臓Marathon-Ready cDNA (クロンテック社製) に対して、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製) により、  
15 以下の条件(1)～(3)で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－57℃10秒間－72℃2.5分間を35サイクル

(3) 72℃5分間

- 20 さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーORFF2 (配列番号: 13) とプライマーORFR2 (配列番号: 14) を用いて、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製) により以下の条件(4)～(6)でnested PCRを行った。

(4) 94℃30秒間

- 25 (5) 94℃10秒間－56℃10秒間－72℃2.5分間を30サイクル

(6) 72℃5分間

上記nested PCR反応液をMin Elute Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて精製した。このDNAを、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン社製) のプロトコールに従ってpCR-Blunt II-TOPOベクターへクローニングした。

これをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCR-BluntII-TCH229の2クローン#1、#2および#3を得た。これをプライマーDNA〔プライマーM13F (配列番号: 15)、プライマーM13R (配列番号: 16)、プライマーORFF2 (配列番号: 13)、プライマーORFR2 (配列番号: 14)、プライマーrr2 (配列番号: 6)、プライマーA1 (配列番号: 17)、プライマーB2 (配列番号: 18)、プライマーff2 (配列番号: 10)、プライマーrr1 (配列番号: 4)、プライマーff1 (配列番号: 9)〕およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、取得した3クローンは同一のDNA断片を含んでおり2251個の塩基配列を有していた (配列番号: 25)。断片には724個のアミノ酸配列 (配列番号: 1) がコードされており (配列番号: 2)、配列番号: 1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ヒトTCH229タンパク質と命名した。

該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR-BluntII-TCH229と命名した。

Blast P (Nucleic Acids Res. 第25巻、3389頁、1997年) を用いて公知のデータベースに対してホモロジー検索を行ったところ、該cDNAは有機アニオントランスポータに属する新規遺伝子であることが判明した (図1および図2)。図中、膜貫通領域をTM1~12で示した。ヒトで報告されている有機アニオントランスポータであるSLC21A12 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 第273巻、251頁、2000年) とはアミノ酸レベルで41%の相同性を、またOATPRP4 (GenBank Accession No. NM 030958) とはアミノ酸レベルで36%の相同性を示し、該タンパク質は12回膜貫通型の構造を有すると推測された。

## 実施例 4

ヒト TCH 229 遺伝子産物の組織分布の解析

ヒト TCH229 の配列から設計した 2 種のプライマー DNA、プライマー TMF (配列番号: 19) およびプライマー TMR (配列番号: 20) と、TaqMan プローブ P 1

- 5 (配列番号: 21) を用いて、ヒトの各組織の cDNA におけるヒト TCH229 の発現量を TaqMan PCR により測定した。

- 10 反応は TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて最初 50℃ 2 分間、さらに 95℃ 10 分間おいた後で、95℃ で 15 秒、60℃ で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

測定に用いたヒトの各組織の cDNA を表 1 に示す。

結果を図 3 および図 4 に示す。

ヒト TCH229 遺伝子産物 (mRNA) は、Human MTC panel I および MTC panel II においては、腎臓で強い発現が見られ、肺、肝臓、脾臓で弱い発現が見られた。

- 15 Human digestive system MTC panel においては、肝臓で比較的強い発現が見られたが、胃から直腸まですべての部位では若干の発現しか見られなかった。

〔表 1〕

20	cDNA	
	(いずれもクロンテック社製)	組 織
	Human MTC panel I	心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、 腎臓、脾臓
	Human MTC panel II	脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、 小腸、結腸、末梢血白血球
25	Human digestive system MTC panel	肝臓、食道、胃、十二指腸、空腸、 回腸、回盲部、盲腸、上行結腸、 横行結腸、下行結腸、直腸

## 実施例 5

マウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流端のクローニング

- 5 PCRクローニングおよび5'RACE PCR クローニングによりマウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

2種のプライマーDNA〔プライマーh243F（配列番号：28）およびプライマーmR1（配列番号：29）〕を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件でPCRを行った。

- 10 (1) 94℃30秒間  
(2) 94℃10秒間－63℃10秒間－68℃2分間を35サイクル  
(3) 68℃3分間

- 上記PCR反応液5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスピ社製）中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37℃・15分、  
15 85℃・15分の反応を行った。これをプライマーh243F（配列番号：28）、プライマーmR1（配列番号：29）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：48に示す塩基配  
20 列を得た。

- 配列番号：48を基にプライマーmrr5（配列番号：30）およびプライマーmrr6（配列番号：31）を設計した。2種のプライマーDNA〔プライマーAP1（配列番号：3）およびプライマーmrr6（配列番号：31）〕を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA  
25 Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件で一次PCRを行った。

- (1) 94℃30秒間  
(2) 94℃10秒間－64℃4分間を40サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2（配列番号：5）とプライマーmrr5（配列番号：30）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（ク

ロンテック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94℃30秒間

(4) 94℃10秒間－64℃3分間を35サイクル

- 上記nested PCR反応液5 $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエスビ社  
5 製)中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1 $\mu$ l加え、  
37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーmrr5 (配列番号：3  
0) およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて  
10 決定した。その結果、配列番号：49に示す塩基配列を得た。

#### 実施例6

マウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの3' 下流端のクローニ  
ング

- 15 3'RACE PCR クローニングによりマウスTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'  
上流塩基配列を明らかにした。

- 2種のプライマーDNA [プライマーAP1 (配列番号：3) およびプライマーmF1  
(配列番号：32)]を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA (クロンテッ  
ク社製)に対して、Advantage 2 DNA Polymerase (クロンテック社製)により、  
20 以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－61℃4分間を40サイクル

- さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2 (配列番号：5) と  
プライマーmff2 (配列番号：33)を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase (ク  
25 ロンテック社製)により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94℃30秒間

(4) 94℃10秒間－61℃3分間を35サイクル

上記nested PCR反応液5 $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit (ユーエスビ社  
製)中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1 $\mu$ l加え、

37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーmff2（配列番号：33）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：50に示す塩基配列を得た。

#### 実施例7

マウスTCH229タンパク質をコードするcDNAのクローニング

2種のプライマーDNA〔プライマーmORFF(4)（配列番号：34）およびプライマーmORFR(2195)（配列番号：35）〕を用いて、マウス腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、pfu turbo DNA Polymerase（ストラタジーン社製）により、以下の条件(1)～(3)で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－56℃10秒間－72℃2分間を35サイクル

15 (3) 72℃5分間

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーmORFF(atg)（配列番号：36）とプライマーmORFR(tga)（配列番号：37）を用いて、pfu turbo DNA Polymerase（ストラタジーン社製）により以下の条件(4)～(6)でnested PCRを行った。

20 (4) 94℃30秒間

(5) 94℃10秒間－56℃10秒間－72℃2分間を30サイクル

(6) 72℃5分間

上記nested PCR反応液10μlにAdvantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）を1.5μl加え、72℃、10分間の反応の後、Min Elute Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて精製した。このDNAを、TOP0 TA Cloning Kit（インビトロジェン社製）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP0ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ（Escherichia coli）TOP10 competent cell（インビトロジェン社製）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローン

をカナマイシンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCR2.1-mTCH229の2クローン#1、#2および#3を得た。これをプライマーDNA〔プライマーM13F (配列番号: 15)、プライマーM13R (配列番号: 16)、プライマーh243F (配列番号: 28)、プライマーmR1 (配列番号: 29)、プライマーh650F (配列番号: 38)、プライマーh910F (配列番号: 39)、プライマーmrr1 (配列番号: 40)、プライマーmrr2 (配列番号: 41)、プライマーmrr3 (配列番号: 42)、プライマーF(45) (配列番号: 43)、プライマーm521R (配列番号: 44)、プライマーmF1 (配列番号: 32)、プライマーmff2 (配列番号: 33)、プライマーmrr6 (配列番号: 31)〕およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、取得した3クローンは同一のDNA断片を含んでおり2169個の塩基配列を有していた (配列番号: 51)。断片には722個のアミノ酸配列 (配列番号: 26) がコードされており (配列番号: 27)、配列番号: 26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、マウスTCH229タンパク質と命名した。

該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体を、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-mTCH229と命名した。

Blast P (Nucleic Acids Res. 第25巻、3389頁、1997年) を用いて公知データベースに対してホモロジー検索を行ったところ、該cDNAはマウスで報告されている有機アニオントランスポーターであるマウスSLC21A11 (Genbank: NP\_076397) と塩基レベルで43.2%、アミノ酸レベルで37%の相同性を示した。またマウスTCH229は有機アニオントランスポーターファミリーに属する新規遺伝子であるヒトTCH229と塩基レベルで83%、アミノ酸レベルで81%の相同性を示したことより、ヒトTCH229のマウスホモログであることが判明した (図5)。図中、膜貫通領域をTM1~12で、またファミリー間で高く保存されているアミノ酸箇所\*で示した。



## 実施例 8

マウス TCH 2 2 9 遺伝子産物の組織分布の解析

マウスTCH229の配列から設計した2種のプライマーDNA、プライマーmTMF（配列番号：45）およびプライマーmTMR（配列番号：46）と、TaqManプローブmP1（配列番号：47）を用いて、マウスの各組織のcDNAにおけるマウスTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

結果を図6に示す。

マウスTCH229遺伝子産物（mRNA）は、mause MTC panel IおよびMTC panel IIにおいては、前立腺で強い発現が見られ、骨髄、目、肺、腎臓においても比較的高い発現が見られた。

15

## 実施例 9

ラットTCH 2 2 9タンパク質をコードするcDNAの5'上流クローニングPCRクローニングおよび5'RACE PCR クローニングによりラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。

マウスTCH229の配列（配列番号：51）を基に設計した2種のプライマーDNA、プライマーm163F（配列番号：56）およびプライマーm2087R（配列番号：57）を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件でPCRを行った。

25

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－60℃10秒間－68℃2.5分間を35サイクル

(3) 68℃5分間

上記PCR反応液 5  $\mu$ lにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスビ社製）中のExonuclease IとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1  $\mu$ l加え、37℃・15分、

85℃・15分の反応を行った。これをプライマーm163F（配列番号：56）、プライマーm2087R（配列番号：57）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：77に示す塩基配列を得た。

配列番号77を基にプライマーr229-rr1（配列番号：58）およびプライマーr229-rr2（配列番号：59）を設計した。2種のプライマーDNA、プライマーAP1（配列番号：3）およびプライマーr229-rr1（配列番号：58）を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－64℃2分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2（配列番号：5）とプライマーr229-rr2（配列番号：59）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94℃30秒間

(4) 94℃10秒間－64℃2分間を35サイクル

上記nested PCR反応液 5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスビ社製）中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーr229-rr2（配列番号：59）とBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：78に示す塩基配列を得た。

#### 実施例10

ラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流端のクローニング

3'RACE PCR クローニングによりラットTCH229タンパク質をコードするcDNAの3'下流塩基配列を明らかにした。

2種のプライマーDNA、プライマーAP1（配列番号：3）およびプライマーrff1（配列番号：60）を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により、以下の条件で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－64℃2分間を35サイクル

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーAP2（配列番号：5）とプライマーrff3（配列番号：61）を用いて、Advantage 2 DNA Polymerase（クロンテック社製）により以下の条件でnested PCRを行った。

(3) 94℃30秒間

(4) 94℃10秒間－64℃2分間を30サイクル

上記nested PCR反応液 5μlにPCR Product Pre-Sequencing Kit（ユーエスピ社製）中のExonucleaseIとShrimp Alkaline Phosphataseをそれぞれ1μl加え、37℃・15分、85℃・15分の反応を行った。これをプライマーrff3（配列番号：61）およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、増幅したDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて決定した。その結果、配列番号：79に示す塩基配列を得た。

#### 実施例 1 1

ラットTCH229タンパク質をコードするcDNAのクローニング

2種のプライマーDNA、プライマーrORFF1（配列番号：62）およびプライマーrORFR12（配列番号：63）を用いて、ラット腎臓Marathon-Ready cDNA（クロンテック社製）に対して、pfu turbo DNA Polymerase（ストラタジーン社製）により、以下の条件(1)～(3)で一次PCRを行った。

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間－56℃10秒間－72℃2.5分間を35サイクル

(3) 72℃5分間

さらに、この一次PCRの産物を鋳型として、プライマーrORFF(atg) (配列番号：64) とプライマーrORFR(tga2) (配列番号：65) を用いて、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製) により以下の条件(4)～(6)でnested PCRを行った。

(4) 94℃30秒間

(5) 94℃10秒間－56℃10秒間－72℃2.5分間を30サイクル

(6) 72℃5分間

上記nested PCR反応液10 $\mu$ lにAdvantage 2 DNA Polymerase (クロンテック社製) を1.5 $\mu$ l加え、72℃、10分間の反応の後、Min Elute Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて精製した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (インビトロジェン社製) のプロトコールに従ってpCRII-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (インビトロジェン社製) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをカナマイシンを含むLB寒天培地で選択し、形質転換体を得た。個々のクローンをカナマイシンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン社製) を用いてプラスミドDNAを調製し、プラスミドクローンpCRII-rTCH229の4クローン#1、#2、#3および#4を得た。これをプライマーDNA [プライマーT7 (配列番号：66)、プライマーSP6 (配列番号：67)、プライマーrORFF(atg) (配列番号：64)、プライマーrORFR(tga2) (配列番号：65)、プライマーrF1 (配列番号：68)、プライマーrTMR (配列番号：69)、プライマーrTMF (配列番号：70)、プライマーrff3 (配列番号：61)、プライマーrff2 (配列番号：71)、プライマーrR1 (配列番号：72)、プライマーr972F (配列番号：73)、プライマーr1123F (配列番号：74)、プライマーr1746R (配列番号：75)] およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて反応を行い、挿入されているcDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて決定した。その結果、取得した4クローンは2種類のDNA断片 (No.1およびNo.2) を含んでいた。No.1は2175個の塩基配列を有

しており（配列番号：80）、断片には724個のアミノ酸配列（配列番号：52）がコードされており（配列番号：53）、配列番号：52で表されるアミノ酸配列を含有していた。No.2は2175個の塩基配列を有しており（配列番号：81）、断片には724個のアミノ酸配列（配列番号：54）がコードされており（配列番号：55）、配列番号：55で表されるアミノ酸配列を含有していた。それぞれのタンパク質を、ラットTCH229タンパク質No.1およびラットTCH229タンパク質No.2と命名した。

該cDNA断片を含むプラスミドを有する形質転換体をそれぞれ、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）TOP10/pCRII-rTCH229No.1およびエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）TOP10/pCRII-rTCH229No.2と命名した。

ラットTCH229タンパク質No.1およびラットTCH229タンパク質No.2には、4箇所（配列番号：53で表される塩基配列の144番目、231番目、1252番目および1539番目）の塩基置換が認められた。4箇所のうちA144T（Glu→Asp）、C231A（Ser→Arg）、A1252T（Ile→Phe）の3箇所は、それぞれ括弧内に示したアミノ酸置換を伴うものであったが、A1539Gはアミノ酸置換は無かった。これらの塩基置換は遺伝子多型（SNPs）に由来する可能性があると考えられる。

Blast P（*Nucleic Acids Res.* 第25巻、3389頁、1997年）を用いて公知データベースに対してホモロジー検索を行ったところ、ラットTCH229No.1およびNo.2は、ラットで報告されている有機アニオントランスポータであるラットoatp-E（*Endocrinology* 第142巻(5)、2005頁、2001年）と塩基レベルで約50%、アミノ酸レベルで約41%の相同性を示した。またラットTCH229No.1およびNo.2は有機アニオントランスポータファミリーに属する新規遺伝子であるヒトTCH229と塩基レベルで約81.4%、アミノ酸レベルで約81.6%の相同性を示したことより、ヒトTCH229のラットホモログであることが判明した（図7および図8）。図中、膜貫通領域をTM1～12で示す。

## 実施例 1 2

### ラットTCH229遺伝子産物の組織分布の解析

ラットTCH229の配列から設計した2種のプライマーDNA、プライマーrTMF（配列

番号：70) およびプライマーrTMR (配列番号：69) と、TaqManプローブrP1 (配列番号：76) を用いて、ラットの各組織 (脾臓、胸腺、精巣、小腸、胃、皮膚、心臓、脳、肺、筋肉、腎臓) のcDNAにおけるラットTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。

- 5 反応はTaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバイオシステムズ社製) にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。結果を図9に示す。
- 10 ラットTCH229遺伝子産物 (mRNA) は、Multiple Choice cDNAs ; RatKitIおよびRatKitII (オリジン社製) においては、肺と腎臓で強い発現が見られ、皮膚、脳においても発現が見られた。

### 実施例 13

- 15 マウスTCH229遺伝子産物の7週齢BALB/cマウスにおける組織分布の解析
- (1) 正常マウス各組織のcDNAの調製
- 7週齢BALB/cマウスの各組織 [ 脳、小脳、海馬、延髄、脊髄、坐骨神経、皮膚、骨格筋、眼球、心臓、肺、気管、脾臓、腎臓、肝臓、前胃、後胃、十二指腸、空回腸、盲腸、結腸、直腸、脾臓、胸腺、骨髄、卵巣、子宮、前立腺、精巣
- 20 (卵巣および子宮は雌から、それ以外は雄から、各1~10匹分を採取) ] より、ISOGEN (ニッポンジーン社製)、またはRNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。
- 25 (2) マウスTCH229遺伝子産物の組織分布の解析
- 実施例8で用いた2種のプライマーDNA、プライマーmTMF (配列番号：45) およびプライマーmTMR (配列番号：46) と、TaqManプローブmP1 (配列番号：47) を用いて、上記のマウス各組織のcDNAにおけるマウスTCH229の発現量 (コピー数) をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH

control reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて rodent  
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量 (コピー数) も測  
定した。反応は TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステム  
ズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバ  
イオシステムズ社製) にて最初 50℃ 2 分間、さらに 95℃ 10 分間おいた後で、95℃  
5 で 15 秒、60℃ で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返し、同時に検出を行  
った。

結果を図 10 に示す。

マウス TCH229 遺伝子産物 (mRNA) は 7 週齢 BALB/c マウスの各組織においては、  
10 前立腺、気管、腎臓、骨髄で若干の発現が見られ、肺で高い発現が見られた。

#### 実施例 14

##### (1) 正常ラット各組織の cDNA の調製

12 週齢 Wistar ラット雄の各組織 (大脳、小脳、肝臓、腎臓、前立腺、心臓、肺、  
15 十二指腸、空回腸、結腸、皮膚、眼球) より、RNeasy Mini Kit (キアゲン社  
製) を用いて total RNA を調製した。調製した total RNA に対して TaqMan  
Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて  
逆転写反応を行い cDNA を調製した。

##### (2) ラット TCH229 遺伝子産物の組織分布の解析

20 実施例 12 で用いた 2 種のプライマー DNA、プライマー rTMF (配列番号: 70)  
およびプライマー rTMR (配列番号: 69) と、TaqMan プローブ rP1 (配列番号:  
76) を用いて、上記のラット各組織の cDNA における ラット TCH229 の発現量 (コ  
ピー数) を TaqMan PCR により測定した。同じ cDNA について TaqMan rodent GAPDH  
control reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて rodent  
25 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量 (コピー数) も測  
定した。反応は TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステム  
ズ社製) を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system (アプライドバ  
イオシステムズ社製) にて最初 50℃ 2 分間、さらに 95℃ 10 分間おいた後で、95℃  
で 15 秒、60℃ で 1 分を 1 反応サイクルとして 40 サイクル繰り返し、同時に検出を行

った。

結果を図11に示す。

ラットTCH229遺伝子産物 (mRNA) は12週齢Wistarラットの組織においては、腎臓、肺で高い発現が見られた。

5

#### 実施例15

ヒトTCH229発現ベクターの構築

ヒトTCH229 (配列番号: 1) 発現ベクターを、以下の方法により作成した。

実施例1により得られたプラスミド10ngを鋳型として、プライマー2290F2 (配列番号: 82) およびプライマー2290R2 (配列番号: 83) を用いて、pfu turbo DNA Polymerase (ストラタジーン社製) により以下の条件 (1) ~ (3) でPCRを行った。5'末端側プライマー2290F2および3'末端側プライマー2290R2は、ベクターへのクローニングのために5'末端側にそれぞれEcoRVサイトおよびXhoIサイトを付加するように設計した。

15

(1) 94℃30秒間

(2) 94℃10秒間-55℃10秒間-70℃2.5分間を35サイクル

(3) 70℃5分間

20

上記PCR反応液をゲル電気泳動後、主要バンドを精製した。これにより得られたPCR断片を、制限酵素EcoRVおよびXhoIを用いて、37℃で1時間保温することにより消化し、この反応液をゲル電気泳動後、精製した。これを、動物細胞発現ベクターであるpcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製) のEcoRVサイトおよびXhoIサイトに、Takara ligation kit ver.2 (タカラバイオ社製) を用いてライゲーションした。このライゲーション反応液をエタノール沈殿処理後、コンピーテント細胞である大腸菌 (Escherichia coli) TOP10 (インビトロジェン社製) に形質転換した。これにより得られた複数のコロニーからプラスミドを調製し、この塩基配列をプライマーDNA [プライマーBGH RV (配列番号: 84)、プライマーT7 (配列番号: 66)、プライマー2290F2 (配列番号: 82)、プライマー2290R2 (配列番号: 83)、プライマーrr2 (配列番号: 6)、プライマーA1 (配列番号: 17)、プライマーB2 (配列番号: 18)、プライマーff2 (配列

25



番号：107、プライマーrr1（配列番号：4）、プライマーff1（配列番号：9）]]、およびBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて反応を行い、塩基配列をDNAシーケンサーABI PRISM 3100 DNAアナライザ（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて確認した。このプラスミドを有する形質転換体を、Escherichia coli TOP10/pCDNA3.1(+)-TCH229と命名した。

#### 実施例 1 6

ヒトTCH229発現CHO細胞株の作製および導入遺伝子発現量の測定

- 10 Escherichia coli TOP10/pCDNA3.1(+)-TCH229を培養し、この大腸菌体から EndoFree Plasmid Maxi Kit（キアゲン社製）を用いてプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをFuGENE 6 Transfection Reagent（ロシュ社製）を用いて添付のプロトコールに従ってCHO dhfr細胞に導入した。2 $\mu$ gのプラスミドDNAとトランスフェクション試薬との混合液を、24時間前に2 $\times$ 10<sup>5</sup>個のCHO dhfr細胞を播種した直径6 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清（JRHバイオサイエンス社製）を含むMEM $\alpha$ 培地（インビトロジェン社製）で1日間培養した後培地に1.0mg/mlのジェネティシン（インビトロジェン社製）を添加し、その後さらにTCH229発現細胞を培養した。途中何回か培地交換を行い、約10日間後トリプシン処理により細胞をはがし、回収した細胞を1wellあたり0.5~1個で96 well plate
- 20 に播種し、その後約10日間1.0mg/mlのジェネティシンを含んだ培地中でTCH229発現細胞を選択した。1wellあたり1コロニーの増殖が見られたwellについて、増殖した細胞からRNeasy Mini KitまたはRNeasy 96 Kit（ともにキアゲン社製）を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。これについて、実施例4で用いた2種のプライマーDNA、プライマーTMF（配列番号：19）およびプライマーTMR（配列番号：20）と、TaqManプローブP1（配列番号：21）を用いて、ヒトTCH229の発現量をTaqMan PCRにより測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（ア

プライドバイオシステムズ社製) にて、最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。ヒトTCH229遺伝子高発現細胞株 (モノクローナル) として、クローンNo. 71を選択した。

5

# 実施例 17

ヒトTCH229遺伝子の市販正常ヒト細胞における発現解析

## (1) 正常ヒト細胞cDNAの調製

正常ヒト細胞はCambrex BioScience Walkersville社製品を購入し、製品添付の使用説明書記載の方法に従って培養した。実験に使用した細胞を表2に示す。

10

表 2

細胞名 (*はTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6刺激あり)	
1	臍帯静脈血管内皮細胞
2	大動脈血管内皮細胞
3	冠状動脈血管内皮細胞
4	大動脈平滑筋細胞
5	冠状動脈平滑筋細胞
6	子宮平滑筋細胞
7	気管支平滑筋細胞
8	骨格筋衛星細胞
9	乳腺上皮細胞
10	気管支上皮細胞 (RA添加)
11	気管支上皮細胞 (RA無添加)
12	肺繊維芽細胞
13	腎臓近位尿細管上皮細胞
14	メサングウム細胞
15	腎臓皮質上皮細胞
16	間葉系幹細胞
17	膝関節軟骨細胞
18	骨芽細胞
19	皮膚微小血管内皮細胞 *
20	肺微小血管内皮細胞 *
21	肺動脈血管内皮細胞 *
22	細気管支上皮細胞 *
23	腎上皮細胞 *
24	前立腺間質細胞 *
25	表皮角化細胞 *

各細胞を75cm<sup>2</sup>培養フラスコにサブコンフルエントになるよう培養した。表中の\*印のついた細胞については、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびIL-6が各々最終濃度が10ng/mlになるように加えた。\*印が付されていない細胞については培養開始から16時間後に、\*印が付された細胞についてはTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびIL-6の混合物を添加してから8時間後に、各細胞を、トリプシン-EDTA処理により回収した。回収した細胞から、ISOGEN（ニッポンジーン社製）、またはRNeasy Mini Kit（キアゲン社製）を用いてtotal RNAを調製した（いずれの場合もDNase処理により混入DNAを除去した）。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

（2）種々の刺激を加えたヒト正常細胞cDNAの調製

a) 腎臓近位尿細管上皮細胞（RPTEC）および腎臓皮質上皮細胞（HRCE）（いずれもCambrex BioScience Walkersville社製）をコラーゲンIコートした24wellプレートに1 $\times$ 10<sup>5</sup>個ずつ播種し、一晚培養後、トリヨードチロニン（T3）フリーのブレッドキットREGM（BIO WHITTAKER社製）に置換し、更に30分培養した。

b) 刺激剤としては、TGF- $\beta$ 1（和光純薬社製）、TNF- $\alpha$ （ジェンザイム社製）、IL-1 $\beta$ （ジェンザイム社製）、IL-6（ジェンザイム社製）およびPMA（和光純薬社製）を用いた。これら5種の刺激剤をそれぞれ、T3フリーのブレッドキットREGM（BIO WHITTAKER社製）で最終濃度が10ng/mlになるよう希釈した溶液を準備した。

c) 上記a) のRPTECおよびHRCEの培養上清を除去後、直ちに上記b) で調製した溶液を、1wellあたり500 $\mu$ lずつ添加し、培養を行なった。コントロールとして、上記5種の刺激剤が溶けている溶媒の混合物を、T3フリーのブレッドキットREGM（BIO WHITTAKER社製）で刺激剤と同じ割合で希釈した溶液を準備し、RPTECおよびHRCEに1wellあたり500 $\mu$ lずつ添加し、培養を行なった。

d) 刺激剤添加後、0.5、1、2、4、6および8時間後に、それぞれ細胞を回収し、RNeasy Mini Kit（キアゲン社製）を用いてtotal RNAを調製した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

### (3) ヒトTCH229遺伝子の市販正常ヒト細胞における発現解析

実施例4で用いた2種のプライマーDNA、プライマーTMF（配列番号：19）およびプライマーTMR（配列番号：20）と、TaqManプローブP1（配列番号：21）を用いて、上記の正常ヒト細胞および刺激剤で刺激したRPTECおよびHRCEからそれぞれ調製したcDNAにおいて、ヒトTCH229の発現量（コピー数）をTaqMan PCRにより測定した。上記の正常ヒト細胞および刺激剤で刺激したRPTECおよびHRCEからそれぞれ調製したcDNAについて、Eukaryotic 18S rRNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてribosomal RNA（18S）の発現量（コピー数）、またはHuman GAPD（GAPDH）（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてhuman glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応は、TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。

ヒト正常細胞におけるヒトTCH229の発現変動を図12に示す。表2において\*印が付された細胞についてはTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ およびIL-6（各々10ng/ml）で刺激したが、無刺激の場合と比較して発現変動はほとんど認められず、かつ発現もほとんど認められなかった。

刺激剤で刺激したRPTECにおけるヒトTCH229の発現変動を図13に、刺激剤で刺激したHRCEにおけるヒトTCH229の発現変動を図14に示す。

ヒトTCH229遺伝子産物（mRNA）は腎臓近位尿細管上皮細胞で特異的な発現が見られ、腎臓皮質上皮細胞で若干の発現が見られた。また、RPTECおよびHRCEを、TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ またはPMAで各々で刺激したときにコントロールと比較して、ヒトTCH229の発現が培養時間依存的に減少することが確認できた。

### 実施例18

腎疾患モデル（Wistar Fatty, SHC, Zucker Fatty）ラット腎臓におけるラットTCH229遺伝子産物の発現解析

疾患モデル動物として、Wistar Fatty ラット (WFラット)、Zucker Fatty ラット (ZFラット)、自然発症高コレステロール血症ラット (SHCラット) の3種類を用い、それぞれに対応する対照として、WFラットに対してはWistar Lean Rat (WLラット)、ZFラットに対してはZucker Lean Rat (ZLラット)、SHCラットに対してはSD Rat (SDラット) を使用した。

Wistar Fattyラット (WFラット) は、腎機能低下症状に加え糖尿病に特徴的な症状を示すことから、糖尿病性腎症モデルとして (Frontiers in diabetes research, lessons from animal diabetes II, 535-541, 1988年)、Zucker Fattyラット (ZFラット) は、WFラットと同様に腎機能低下と糖尿病の症状を合わせて呈することから、糖尿病性腎症モデルとして (Kidney international, 52巻, S218-S220頁, 1997年)、自然発症高コレステロール血症ラット (SHCラット) は、ヒト巣状糸球体硬化症と類似の症状を示すことから、巣状糸球体硬化症モデルとして (日本腎臓学界誌, 37巻, 91-99頁, 1995年) 報告されている。

(1) 疾患モデル動物と対照動物を同じ条件で飼育し、WFラットおよびWLラットでは生後13週 (発症前)、20週 (発症後)、42週 (進展期) および68週 (腎機能低下期) に、SHCラットおよびSDラットでは生後6週 (発症前)、12週 (発症後)、20週 (進展期) および26~30週 (腎機能低下期) に、ZFラットおよびZLラットでは生後8週 (発症前) および27週 (発症後) に、以下のようにtotal RNAを抽出した。

WFラット群 (各週齢n=5)、WLラット群 (各週齢n=5)、SHCラット群 (各週齢n=5)、SDラット群 (各週齢n=5)、ZFラット群 (各週齢n=9)、ZLラット群 (各週齢n=9) の腎臓を、乳頭部を含む割断面で約100mgになるようにスライスし、ISOGENを用いて、添付のマニュアルに従い、total RNAを抽出した。さらにQIAGEN RNeasy Mini kit (キアゲン社製) およびRNase-Free DNase set (キアゲン社製) を用いて、混入DNAを除去した。調製したtotal RNA に対してTaqMan Reverse Transcription Reagents (アプライドバイオシステムズ社製) を用いて逆転写反応を行いcDNAを調製した。

(2) 腎疾患モデルラット腎臓におけるラットTCH229遺伝子産物の発現解析  
実施例12で用いた2種のプライマーDNA、プライマーrTMF (配列番号: 70)

- およびプライマーrTMR（配列番号：69）と、TaqManプローブrPl（配列番号：76）を用いて、上記（1）で調製した腎疾患モデルラット腎臓cDNAにおけるラットTCH229の発現量（コピー数）をTaqMan PCRにより測定した。同じcDNAについてTaqMan rodent GAPDH control reagents（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてrodent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）の発現量（コピー数）も測定した。反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、ABI PRISM 7900 sequence detection system（アプライドバイオシステムズ社製）にて最初50℃2分間、さらに95℃10分間おいた後で、95℃で15秒、60℃で1分を1反応サイクルとして40サイクル繰り返し、同時に検出を行った。WFラット群の結果を図15、SHCラット群の結果を図16に、ZFラット群の結果を図17にそれぞれ示す。

ラットTCH229は3種類すべての腎疾患モデルラット腎臓で、腎障害が発症した後にその発現が各対照群と比べて減少した。このことから、TCH229は腎症などの腎疾患に関与する可能性が考えられる。

15

#### 産業上の利用可能性

- 本発明のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび抗体などは、例えば腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髄性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髄炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患（例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、ク

25

レチン病、甲状腺機能亢進症など) ) などの診断マーカー等として有用である。  
該タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体などを用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、該タンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物、該タンパク質の発現を促進または阻害

- 5 する化合物などは、例えば、腎疾患（例、腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、巣状糸球体硬化症、ネフローゼ症候群、腎性浮腫、間質性腎炎、腎硬化症、尿毒症など）、肝臓疾患（例、肝硬変、肝炎、アルコール性肝臓疾患など）、脾臓疾患（例、脾炎など）、胸腺異常に伴う免疫疾患、生殖器疾患（例、前立腺肥大症、前立腺炎、精巣神経症、卵巣嚢腫など）、消化器性疾患（例、過敏性腸症候群、
- 10 潰瘍性大腸炎、虚血性大腸炎、胃炎など）、脾臓疾患（例、脾機能亢進症、脾腫性症候群など）、癌（例、肺癌、腎臓癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌、脾臓癌、甲状腺癌、骨髓性白血病など）、呼吸器疾患（例、胸膜炎、肺炎、慢性閉塞性肺疾患、喘息など）、骨髓炎、糖尿病、高血圧、虚血後再灌流障害、網膜炎、中枢神経疾患
- 15 （例、てんかん、アルツハイマー病、パーキンソン症候群、精神分裂病など）、皮膚疾患（例、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎など）、甲状腺ホルモン関連疾患（例、甲状腺ホルモン不応症、バセドウ病、クレチン病、甲状腺機能亢進症など）などの予防・治療剤などとして使用することができる。好ましくは腎疾患、甲状腺ホルモン関連疾患などの予防・治療剤として、さらに好ましくは糖尿病性
- 20 腎症などの予防・治療剤として使用する。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1、配列番号：26または配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
2. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
3. 配列番号：26で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
4. 配列番号：52で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
5. 配列番号：52で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：54で表わされるアミノ酸配列である請求項1記載のタンパク質またはその塩。
6. 配列番号：54で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
7. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
8. 請求項1記載のタンパク質または請求項7記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
9. DNAである請求項8記載のポリヌクレオチド。
10. 配列番号：2、配列番号：27、配列番号：53または配列番号：55で表わされる塩基配列からなるポリヌクレオチド。
11. 請求項8記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
12. 請求項11記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
13. 請求項12記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質または請求項7記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。
14. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。



15. 請求項8記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
16. 請求項8記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
17. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
- 5 18. 請求項17記載の抗体を含有してなる診断薬。
19. 請求項17記載の抗体を含有してなる医薬。
20. 請求項8記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。
21. 請求項20記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
- 10 22. 請求項20記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
23. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 15 24. 請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 25 25. 請求項23記載のスクリーニング方法または請求項24記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質もしくは請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩。
26. 請求項25記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
27. 請求項8記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
28. 請求項8記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

29. 請求項27記載のスクリーニング方法または請求項28記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。
30. 請求項29記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
- 5 31. 請求項17記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質の定量方法。
32. 請求項31記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質の機能が関連する疾患の診断法。
33. 請求項17記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1記載のタン
- 10 パク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。
34. 請求項17記載の抗体を含有してなる、請求項1記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
35. 請求項33記載のスクリーニング方法または請求項34記載のスクリー
- 15 ング用キットを用いて得られる、請求項1記載のタンパク質の発現を促進または阻害する化合物またはその塩。
36. 請求項35記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。
37. 腎疾患の予防・治療剤である請求項14、請求項15、請求項19、請求項22、請求項26、請求項30または請求項36記載の医薬。
38. 哺乳動物に対して、請求項25、請求項29または請求項35記載の化
- 20 合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする腎疾患の予防・治療方法。
39. 腎疾患の予防・治療剤を製造するための請求項25、請求項29または請求項35記載の化合物またはその塩の使用。

TCH229 M K S A K - G I E N - - - - - L A F V P S S P D I L R R - - - - - L S A S P S - - - - - Q I E V S A L S S D 38  
SLC21A12 M P L H Q L G D K P - - - - - L T F P S P N S A M E N G - - - - - L D H T P P S R R A S P G T P L S P G 42  
OATPRP4 M D E G T - G L Q P G A G E Q L E A P A T A E A V Q E R C E P E T L R S K S L P V L S S A S C - - - - - R P S L S P T S G D 56

TCH229 P Q R E - - - - - N S Q P Q E L Q K P Q E P Q K S P E P S L - P S A P P N V S E E K L - - - - - R S L S L S E F E E G S Y G 89  
SLC21A12 S L R S - - - - - A A - - - - - H S P L D T S K Q P L C Q L W A E K H G A R G T H E V - - - - - R Y V S A G - - - - - Q S V A C G 87  
OATPRP4 A N P A F G C V D S - - - - - S G H Q E L K Q G P N P L A - P S P S A P S T S A G L G D C N H R V D L S - - - - - K T F S V S 108

TCH229 W R N F H - - - - - P Q C L - Q R C N T P G G F L L H Y C L L A V T Q G I V N G L V N I S I S T V E K R Y E M K S S L T 144  
SLC21A12 W W A P A - - - - - P P C L - Q V L N T P K G I L F P F L C A A A F L Q G M T V N G F I N T V I T S L E R R Y D L H S Y Q S 142  
OATPRP4 - S A L A M L Q E R R C L Y V V L T D S R C P L V C M C P L T P I Q A L M V S G Y L S S V I T T I E R R Y S L K S S E S 167

TCH229 G L I S S S Y D I S P C L L S L F V S P F G E R G H K K P R W L A F A F M I G L G A L V P S L P Q F F S G E E Y K L G S L 204  
SLC21A12 G L I A S S Y D I A A C L C L T F V S Y F G G S G H K K P R W L G W G V L L M G T G S L V F A L P H F T A G R Y E V E L D 202  
OATPRP4 G L L V S C F D I G N L V V V F V S Y F G G R G R R P L W L A V G G L L I A F G A A L P A L P H P I S P P Y Q I Q E L 227

TCH229 P - - - - - E D T C V T T R N S T S C T S S T S S L S N - - - - - Y L Y V F I L G Q L L L G A G G T P L Y T L G T A 252  
SLC21A12 A - - - - - G V R T C P A N P G A V C A D S T S G L S R - - - - - Y Q L V F M L G Q F L H G V G A T P L Y T L G V T 250  
OATPRP4 N A S A P N D G L C Q G G N S T A T L E P P A C P K D S G G N N H W Y L A L F I C A Q I L I G M G S T P I Y T L G P T 287

TCH229 F L D D S V P T H K S S L Y I G T G Y A M S I L G P A I G Y V L G G Q L L T I Y I D V A M G E S T D V T E D D P R W L G 312  
SLC21A12 Y L D D E N V K S S C S P V Y I A I F Y T A A I L G P A A G Y L I G G A L L N I Y T E - - - - - M G R R T E L T T E S P L W V G 308  
OATPRP4 Y L D D N V K K E N S S L Y L A I M Y V M G A L G P A V G Y L L G G L L I G P Y V D - - - - - P R N P V H L D Q N D P R F I G 345

TCH229 A W I G P L L S W I P A W S L I I P F S C P P K H L P G T A E - - - - - I Q A G K T S Q A H Q - - - - - S N S N - - - - - 359  
SLC21A12 A W W V G F L G S G A A A F T A V P I L G Y P R Q L P G S Q R - - - - - Y A V M R A A E M H Q L K D S S R G E A - - - - - 360  
OATPRP4 N W S G F L L C A I A M F L V I P P M F T P P K K L P P R H K K K K K K P S V D A V S D D D V L K E K S N N S E Q A 405

TCH229 - - - - - A D V K F G K S I K D P P A A L K N L M K N A V P M C L V L S T S S E A L I T T G P A T P L P K P I E N Q P G L 415  
SLC21A12 - - - - - S N P D P G K T I R D L P L S I W L L L K N P T F I L L C L A G A T E A T L I T T G M S T P S P K P L E S Q P S L 416  
OATPRP4 D K K V S S M G F G K D V R D L P R A A V R I L S N M T F L F V S L S Y T A E S A I V T A F I T P I P K P I E S Q P G I 465

TCH229 T S P A A T L G G A V L I P G A A L G Q I L G G F L V S K P R M T C K N T M K P A L F T S G V A L T - L S P V P M Y A 474  
SLC21A12 S A S E A A T L P G Y L V V P A G G G G T F L G G F P V N K L R L R G S A V I K P C L F C T V V S L L - G I L V F S - L 474  
OATPRP4 P A S N A S I Y T G V I I V P S A G V G I V L G G Y I I K K L K L G A R E S A K L A M I C S G V S L L C F S T L F I - V 524

2/17

2

TCH229 K C E N E P P A G V S E S Y N G T - - - G E L - - - - - G N L I A P C N A N C N C S R S Y Y Y P V C G - D G V Q Y P S 524  
SLC21A12 H C P S V P M A G V T A S Y G G S L L P E G H L - - - - - N L T A P C N A A C S C Q P E H Y S P V C G S D G L M Y P S 528  
OATPRP4 G C E S I N L C G I N I P Y T T G - - - P S L T M P H R - N L T G S C N V N C G C K I H E Y E P V C G S D G I T Y P N 579

TCH229 P C F A G C S N P V A - H R K - - P K V Y Y N C S C I E R K T B I T S T A E T - - - - - P G F E A 565  
SLC21A12 L C H A G C P A A T E - T N V D G Q K V Y R D C S C I P - - - - - Q N L S S G - - - - - P G - H A 565  
OATPRP4 P C L A G C V N S G N L S T G - - I R N Y T E C T C V Q S R Q V I T P P T V G Q R S Q L R V V I V K T Y L N E N G - Y A 636

TCH229 K A G K C E T H C A K L P I F L C I P F I V I I P T P M A G T P I T V S I L R C V N H R Q R S L A L G I Q F M V L R L L 625  
SLC21A12 T A G K C T S T C Q R K P L L L V F I P V V I F F T F L S S I P A L T A T L R C V R D P Q R S P A L G I Q W I V V R I L 625  
OATPRP4 V S G K C K R T C T C N T L I P F L V F L F I V T F I T A C A Q P S A I I V T L R S V E D E E R P F A L G M Q F V L L R T L 696

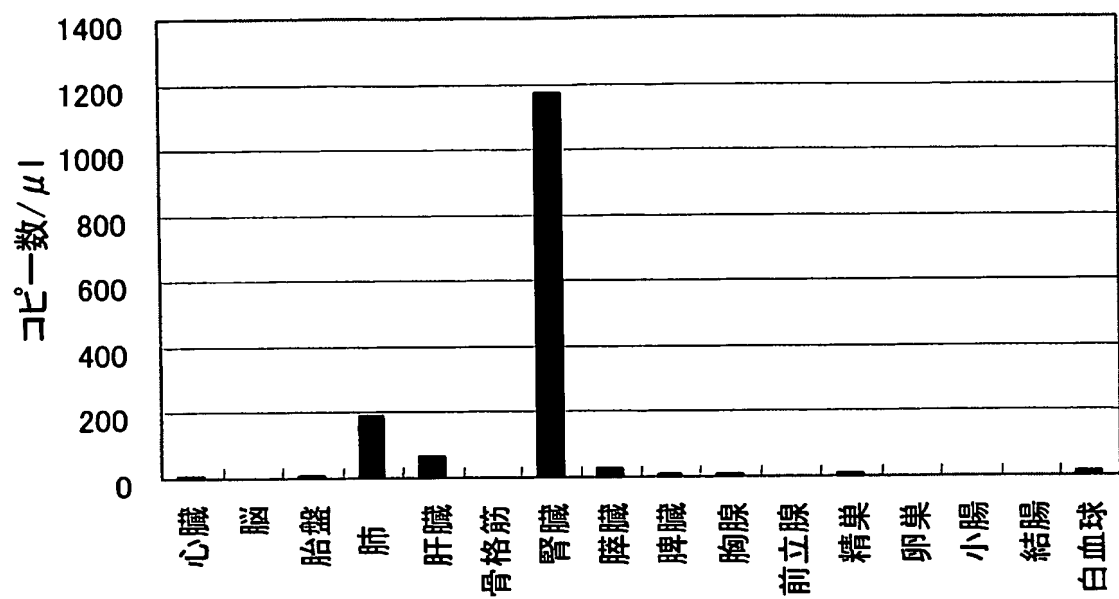
TCH229 G T I P G P I I F G P T I D S T C I L W D I N D C G I K G A C W I Y D N I K M A H M L V A I S V T C K V I T M F P N G F 685  
SLC21A12 G G I P G P I A P G W V I D K A C L L W Q - D Q C G Q Q G S C L V Y Q N S A M S R Y I L I M G L L Y K V L G V L F F A I 684  
OATPRP4 A Y I P T P I Y P G A V I D T T C M L W Q - Q E C G V Q G S C W E Y Y N V T S F R F V Y F G L A A G L K F V G F I F - - - 752

TCH229 A I F L - - - - - Y K - - - - - P P P S A T D V S F - - - - - 701  
SLC21A12 A C F L - - - - - Y K - - - - - P L S E S S D - G L - - - - - 699  
OATPRP4 - I P L A W Y S I K Y K E D G L Q R R R Q R E F P L S T V S E - R V G H P D N A R T R S C P A F S T Q G E P H E E T G L 810

TCH229 - - - - - - - - - - - H K - - - - - E N A V V T N V L A E Q - - - - - L N K I V K E G . 725  
SLC21A12 - - - - - - - - - - - E T C L P S Q S S A P D S A T D S - - - - - Q L Q S S V 722  
OATPRP4 Q K G I Q C A A Q T Y P G P P E A - - - - - I S S S A D P G L E E S P A A L E P P S 848

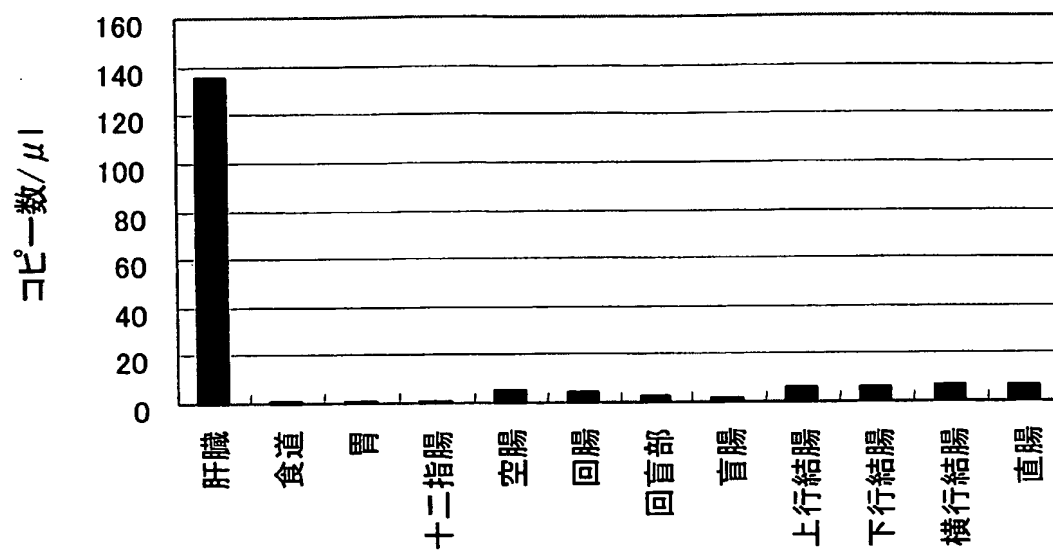
3/17

図 3



4/17

☒ 4



5/17

5

TCH229 M K S A K G I E N L A F V P S S P D I L R R L S A S P S Q I E V S A L S S D P Q R E N S O P Q R L Q 50  
 mTCH229 M Q G S K G I E N P A F V P S S P G T P R R A S A S P S Q V E V S A V A S R N Q N G G S O P R E - - 48

TCH229 K P Q E P Q K S P E P S L P S A P P N V S E E K L R S L S L S E F E E G S Y G W R N F H P Q C L O R 100  
 mTCH229 - S E P Q K S T E P S P P S S N P P A S D E P - P G S Q L S E L E E G P C G W R G F H P Q C L O R 96

TCH229 C N T P G G F L L H Y C L L A V T Q G I V V N G L V N I S I S T V E K R Y E M K S S L T G L I S S S 150  
 mTCH229 C N T P Q G F L L H Y C L L A L T Q G I V V N G L V N I S I S T I E K R Y E M K S S L T G L I S S S 146

TCH229 Y D I S F C L L S L F V S F F G E R G H K P R W L A F A F H I G L G A L V F S L P Q F F S G R Y K 200  
 mTCH229 Y D I S F C V L S L F V S F F G E R G H K P R W L A F A S F M I G L G A L V F S L P H F F S G R Y E 196

TCH229 L G S L F E D T C V T T R N S T S C T S S T S S L S N Y L Y V F I L G Q L L L G A G G T P L Y T L G 250  
 mTCH229 L G S I F E D T C L T - R N S T R C S S S T S L L S N Y F Y V F V L G Q L L L G T G G T P L Y T L G 245

TCH229 T A F L D D S V P T H K S S L Y I G T G Y A M S I L G P A I G Y V L G G Q L L T I Y I D V A M G E S 300  
 mTCH229 T A F I D D S V P T H K S S L Y I G I G Y S M S I L G P A I G Y V L G G Q L L T M Y I D I A M G Q S 295

TCH229 T D V T E D D P R W L G A W W I G F L L S W I F A W S L I I P F S C F P K H L P G T A E I Q A G K T 350  
 mTCH229 S D L T E D D P R W L G A W W I G F L L A W L F A W S L I M P F S C F P K H L P G T A K I Q A G K T 345

TCH229 S Q A H Q S N S N A - - - D V K F G K S I K D F P A A L K N L M K N A V F M C L V L S T S S R A L 396  
 mTCH229 S Q T H Q N S T S F Q H T D E N F G K S I K D F P T A V K N L M R N T V F I C L V L S T T S E A L 395

TCH229 I T T G F A T F L P K F I E N Q F G L T S S F A A T L G G A V L I P G A A L G Q I L G G F L V S K F 446  
 mTCH229 I T T G F A T F L P K F I E N Q F G L T S S F A A T L G G A V L I P G A A L G Q I L G G V L V S K F 445

TCH229 R M T C K N T M K F A L F T S G V A L T L S F V F M Y A K C E N E P F A G V S E S Y N G T G E L G N 496  
 mTCH229 K M K C K N T M K F A L C T S G V A L V L S F V F I Y A K C E N E P F A G V S E S Y N G T G E M G N 495

TCH229 L I A P C N A N C N C S R S Y Y Y P V C G - D G V Q Y F S P C F A G C S N P V A H R K P K V Y Y N C 545  
 mTCH229 L T A P C N A N C N C L R S Y Y Y P L C G S D G I Q Y F S P C F A G C L N S V S N R K P K V Y Y N C 545

TCH229 S C I E R K T E I T S T A B T P G F E A K A G K C E T H C A K L P I F L C I F F I V I I F T F M A G 595  
 mTCH229 S C I E R - - K I T S T A B S T D F E A K A G K C R T R C S N L P I F L G I F F I T V I I F T F M A G 593

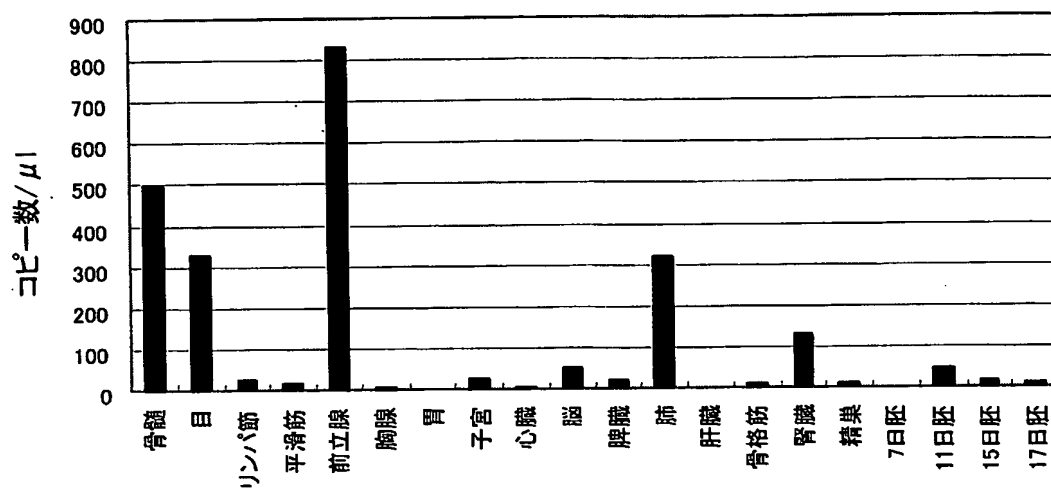
TCH229 T P I T V S I L R C V N H R Q R S L A L G I Q F M V L R L L G T I P G P I I F G F T I D S T C I L W 645  
 mTCH229 T P I T V S I L R C V N H R H R S L A L G V Q F M L L R L L G T I P G P I I F G V I I D S T C V L W 643

TCH229 D I N D C G I K G A C W I Y D N I K M A H M L V A I S V T C K V I T M F F N G F A I F L Y K P P P S 695  
 mTCH229 D V N E C G I K G A C W I Y D N I K M A H M L V A I S V T C K V I T I F F N G L A I V L Y K P P P P 693

TCH229 A T D V S F H K E N A V V T N V L A E Q D L N K I V K E G . 725  
 mTCH229 G T E V S F Q S Q N V I V S T I S V E E D L D K A E N E G . 723

6/17

図 6





7/17

7

TCH229 M K S A K G I E N L A F V P S S P D I L R R L S A S P S Q I E V S A L S S D P Q R E N S Q 45  
rTCH229No.1 M Q G S K G V E N P A F V P S S P D T P R R A S A S P S Q V E V S A V A S R N Q N G G S Q 45  
rTCH229No.2 M Q G S K G V E N P A F V P S S P D T P R R A S A S P S Q V E V S A V A S R N Q N G G S Q 45

TCH229 P Q E L Q K P Q E P Q K S P E P S L P S A P P N V S E E K L R S L S L S E F E E G S Y G W 90  
rTCH229No.1 P R E - - - S E D P Q K S T E P S P P S S T L P A S D E P - P G S Q L S E L E E G P C G W 86  
rTCH229No.2 P R D - - - S E D P Q K S T E P S P P S S T L P A S D E P - P G S Q L R E L E E G P C G W 86

TM1

TCH229 R N F H P Q C L Q R C N T P G G F L L H Y C L L A V T Q G I V V N G L V N I S I S T V E K 135  
rTCH229No.1 R N F H P Q C L Q R C N N P K G F L L H Y C L L A L T Q G I V V N G L V N I S I S T I E K 131  
rTCH229No.2 R N F H P Q C L Q R C N N P K G F L L H Y C L L A L T Q G I V V N G L V N I S I S T I E K 131

TM2

TCH229 R Y E M K S S L T G L I S S S Y D I S F C L L S L F V S P F G E R G H K P R W L A F A A F 180  
rTCH229No.1 R Y E M K S S L T G L I S S S Y D I S F C V L S L F V S P F G E R G H K P R W L A F A S F 176  
rTCH229No.2 R Y E M K S S L T G L I S S S Y D I S F C V L S L F V S P F G E R G H K P R W L A F A S F 176

TM3

TCH229 M I G L G A L V F S L P Q F F S G E Y K L G S L F E D T C V T T R N S T S C T S S T S S L 225  
rTCH229No.1 M I G L G A L V F S L P H F F S G R Y E L G T I F E D T C L T - R N S T R C A S S T S L L 220  
rTCH229No.2 M I G L G A L V F S L P H F F S G R Y E L G T I F E D T C L T - R N S T R C A S S T S L L 220

TM4

TCH229 S N Y L Y V F I L G Q L L L G A G G T P L Y T L G T A F L D D S V P T H K S S L Y I G T G 270  
rTCH229No.1 S N Y F Y V F V L G Q L L L G T G G T P L Y T L G T A F I D D S V P T H K S S L Y I G I G 265  
rTCH229No.2 S N Y F Y V F V L G Q L L L G T G G T P L Y T L G T A F I D D S V P T H K S S L Y I G I G 265

TM5

TCH229 Y A M S I L G P A I G Y V L G G Q L L T I Y I D V A M G E S T D V T E D D P R W L G A W W 315  
rTCH229No.1 Y S M S I L G P A I G Y V L G G Q L L T M Y I D V A M G Q S S D L T E D D P R W L G A W W 310  
rTCH229No.2 Y S M S I L G P A I G Y V L G G Q L L T M Y I D V A M G Q S S D L T E D D P R W L G A W W 310

TM6

TCH229 I G F L L S W I P A W S L I I P F S C F P K H L P G T A E I Q A G K T S Q A H Q S N S N A 360  
rTCH229No.1 I G F L L A W L P A W S L I M P F S C F P K H L P G T A K I Q A G K T S Q T H Q N N S T S 355  
rTCH229No.2 I G F L L A W L P A W S L I M P F S C F P K H L P G T A K I Q A G K T S Q T H Q N N S T S 355

TM7

TCH229 - - - - D V K F G K S I K D F P A A L K N L M K N A V F M C L V L S T S S E A L I T T G F 401  
rTCH229No.1 F Q H M D E N F G K S I K D F P T A V K N L M R N T V F I C L V L S T T S E A L V T T G F 400  
rTCH229No.2 F Q H M D E N F G K S I K D F P T A V K N L M R N T V F I C L V L S T T S E A L V T T G F 400

TM8

TCH229 A T F L P K F I E N Q F G L T S S F A A T L G G A V L I P G A A L G Q I L G G V L V S K P 446  
rTCH229No.1 A T F L P K F I E N Q F G L T S S I A A T L G G A V L I P G A A L G Q I L G G V L V S K P 445  
rTCH229No.2 A T F L P K F I E N Q F G L T S S F A A T L G G A V L I P G A A L G Q I L G G V L V S K P 445

TM9

TCH229 R M T C K N T M K F A L F T S G V A L T L S P V F M Y A K C E N E P F A G V S E S Y N G T 491  
rTCH229No.1 K M K C K N T M K F A L C T S G V A L M L S P V F I Y A K C E N G P F A G V S E S Y N G T 490  
rTCH229No.2 K M K C K N T M K F A L C T S G V A L M L S P V F I Y A K C E N G P F A G V S E S Y N G T 490

8/17

8

TCH229 G E L G N L I A P C N A N C N C S R S Y Y Y P V C G - D G V Q Y F S P C F A G C S N P V A 535  
 rTCH229No.1 G E M G N L T A P C N A N C N C L R S Y Y Y P L C G S D G V Q Y F S P C F A G C L N S V S 535  
 rTCH229No.2 G E M G N L T A P C N A N C N C L R S Y Y Y P L C G S D G V Q Y F S P C F A G C L N S V S 535

TCH229 H R K P K V Y Y N C S C I E R K T E I T S T A E T F G F E A K A G K C E T H C A K L P I F 580  
 rTCH229No.1 N R K P K A Y Y N C S C I E R K V D I T S T A E S P D F E A R A G K C K T Q C S N L P I F 580  
 rTCH229No.2 N R K P K A Y Y N C S C I E R K V D I T S T A E S P D F E A R A G K C K T Q C S N L P I F 580

TM10  
 TCH229 L C I F F I V I I P T F M A G T P I T V S I L R C V N H R Q R S L A L G I Q F M V L R L L 625  
 rTCH229No.1 L G I F F I T V I P T F M A G T P I T V S I L R C V N H R Q R S L A L G V Q F M L L R L L 625  
 rTCH229No.2 L G I F F I T V I P T F M A G T P I T V S I L R C V N H R Q R S L A L G V Q F M L L R L L 625

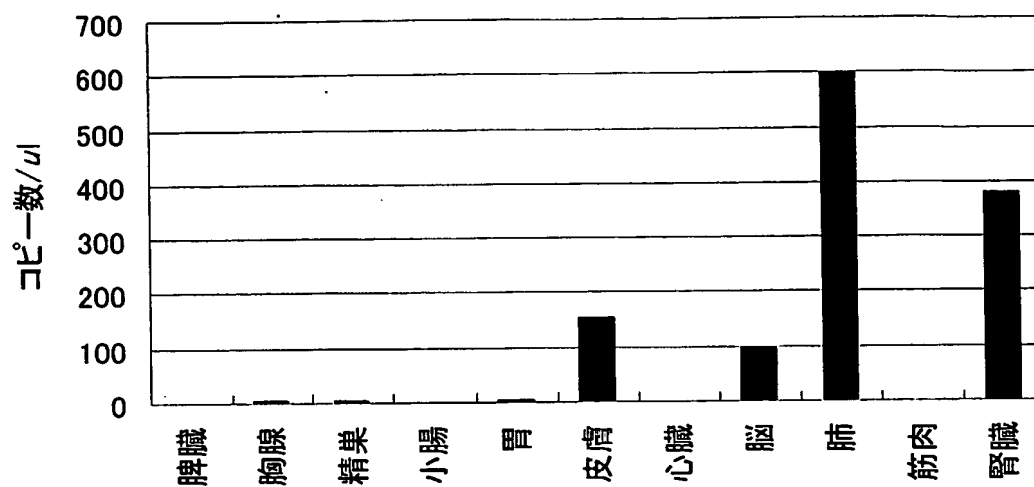
TM11  
 TCH229 G T I P G P I I F G F T I D S T C I L W D I N D C G I K G A C W I Y D N I K M A H M L V A 670  
 rTCH229No.1 G T I P G P I I F G V T I D S T C V L W D I N E C G T K G A C W I Y D N I R M A H M L V A 670  
 rTCH229No.2 G T I P G P I I F G V T I D S T C V L W D I N E C G T K G A C W I Y D N I R M A H M L V A 670

TM12  
 TCH229 I S V T C K V I T M F F N G F A I F L Y K P P P S A T D V S F H K E N A V V T N V L A E Q 715  
 rTCH229No.1 I S V T C K V I T I F F N G L A I V L Y K P P P P G T E V S F Q S Q N V V S T I T V E E 715  
 rTCH229No.2 I S V T C K V I T I F F N G L A I V L Y K P P P P G T E V S F Q S Q N V V S T I T V E E 715

TCH229 D L N K I V K E G . 725  
 rTCH229No.1 D L N K I E N E G . 725  
 rTCH229No.2 D L N K I E N E G . 725

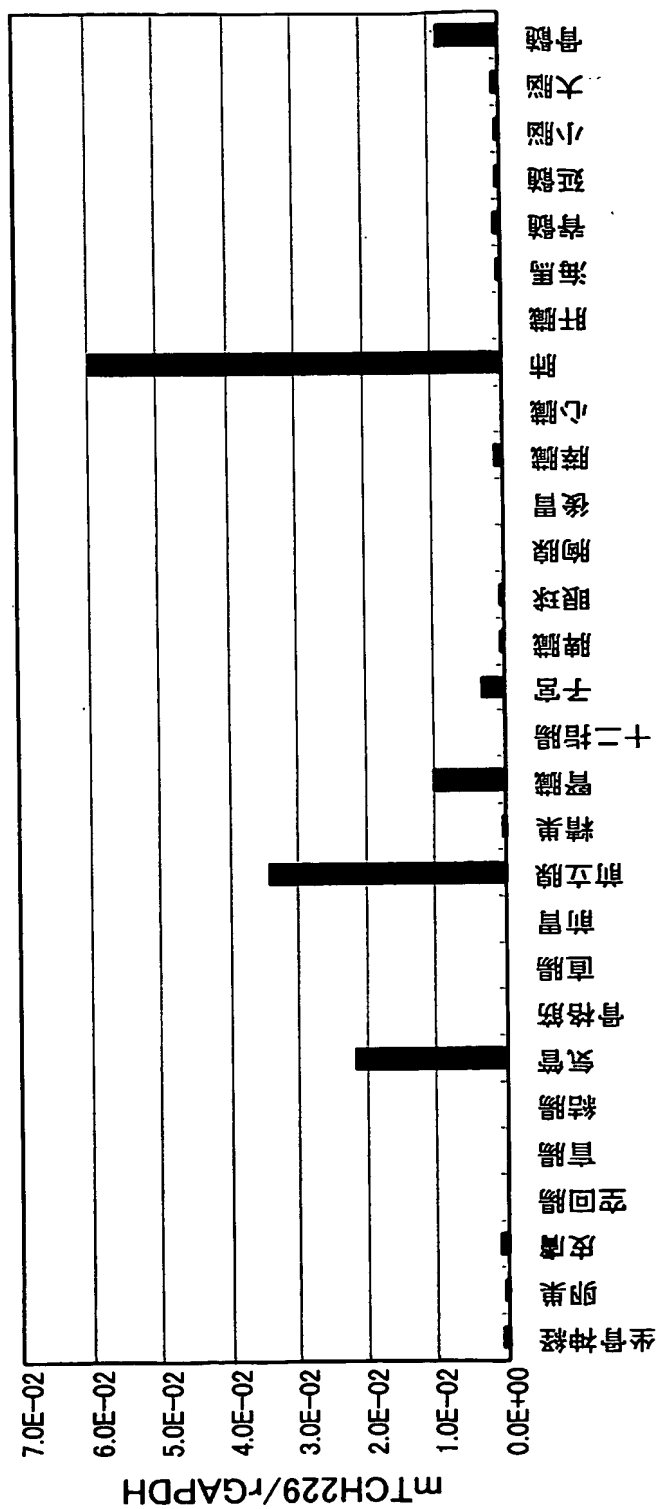
9/17

図 9



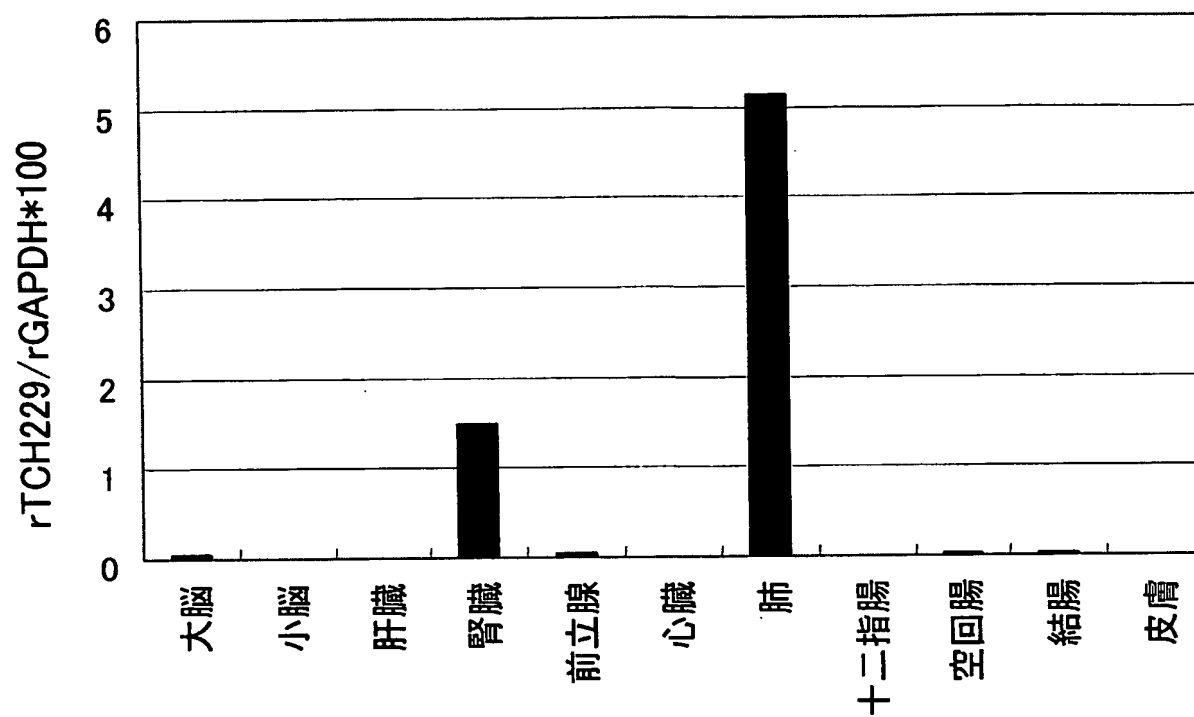
10/17

1 O



11/17

☒ 1 1



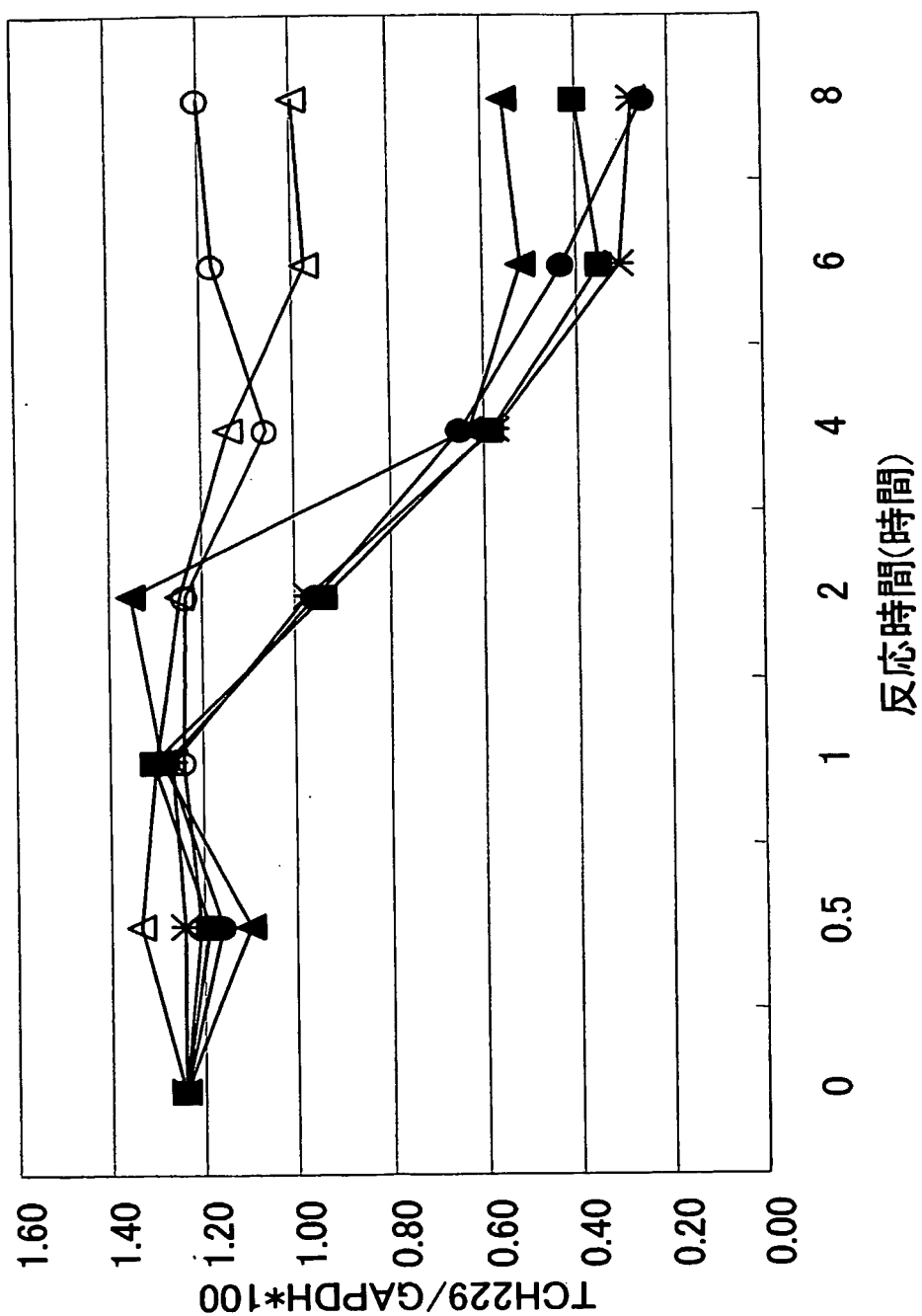
12/17

図 1 2



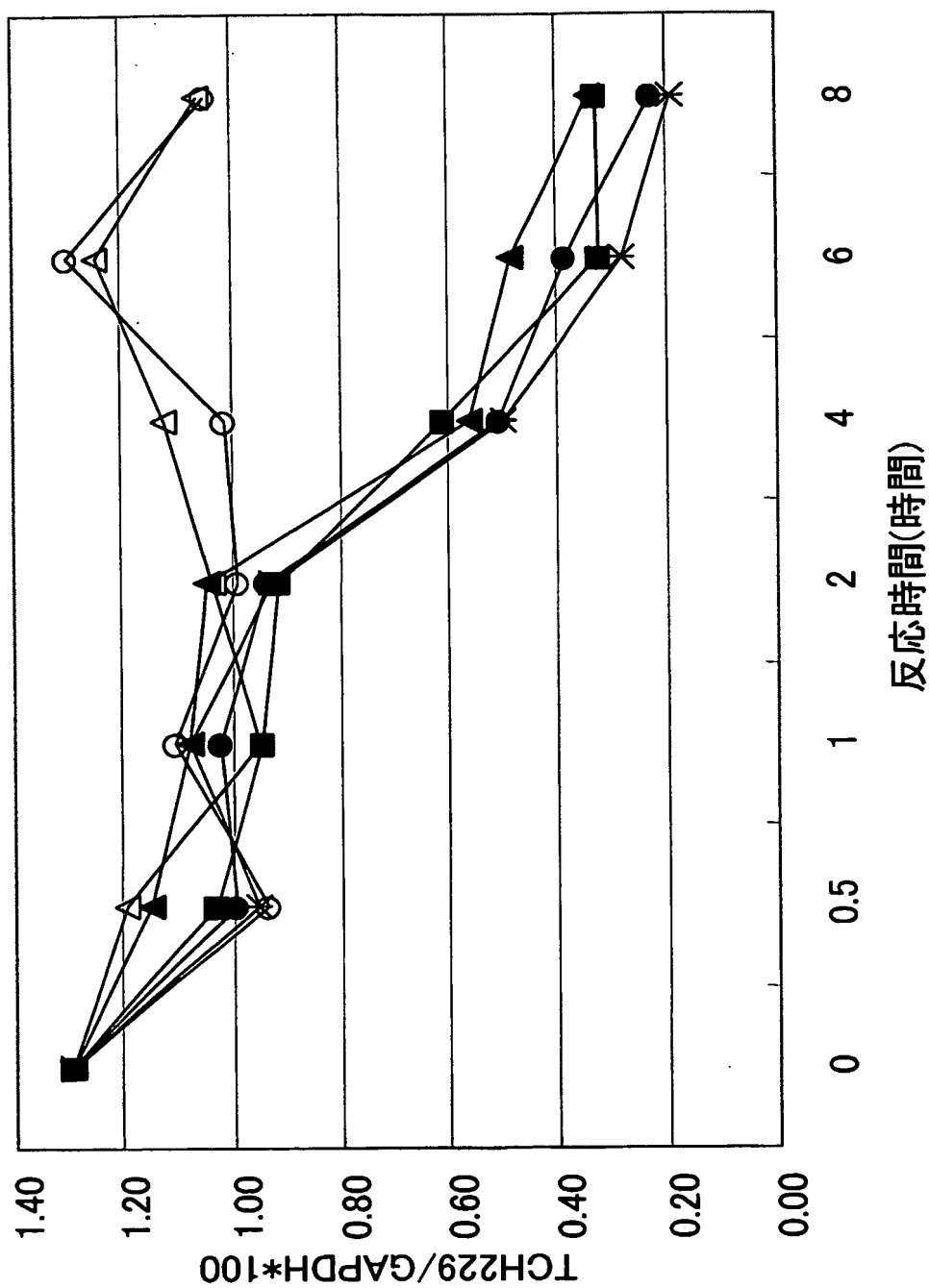
13/17

図 1 3



14/17

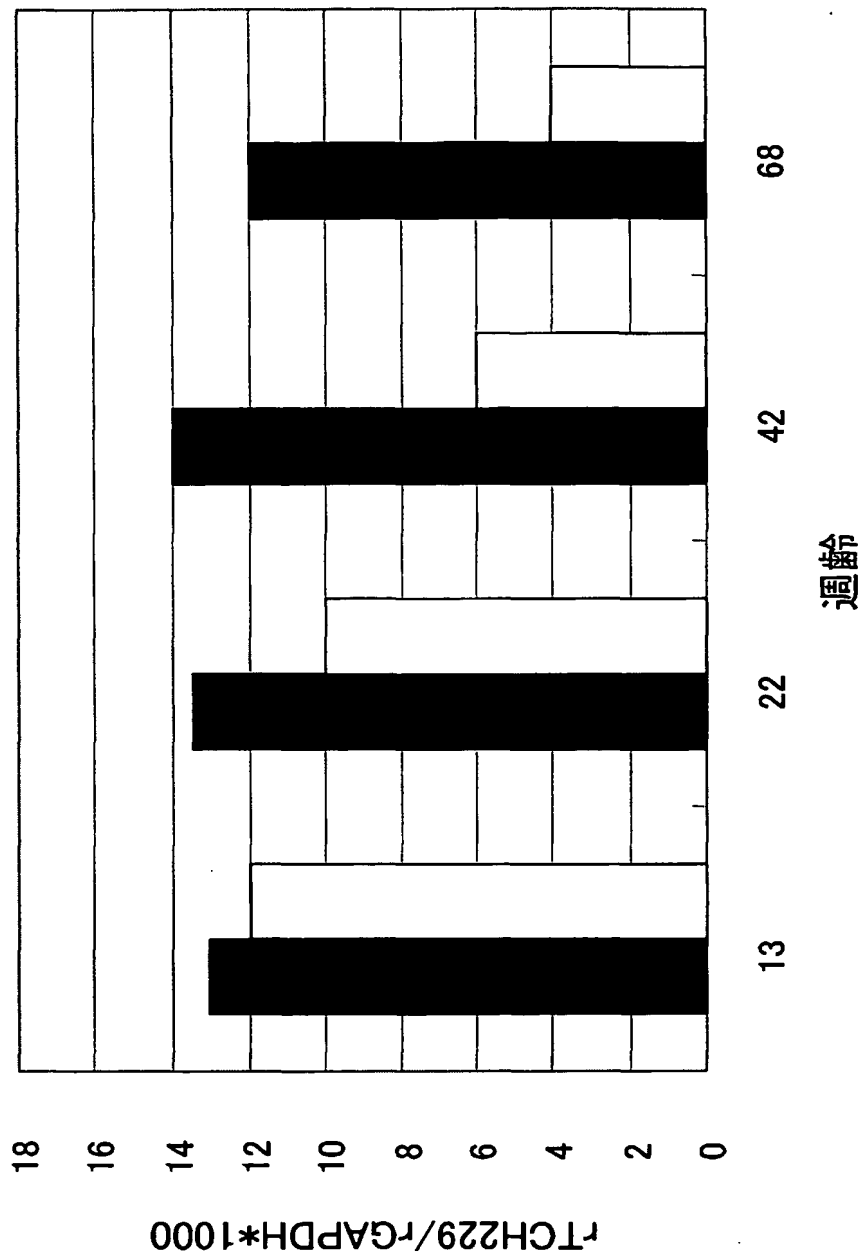
図 1 4





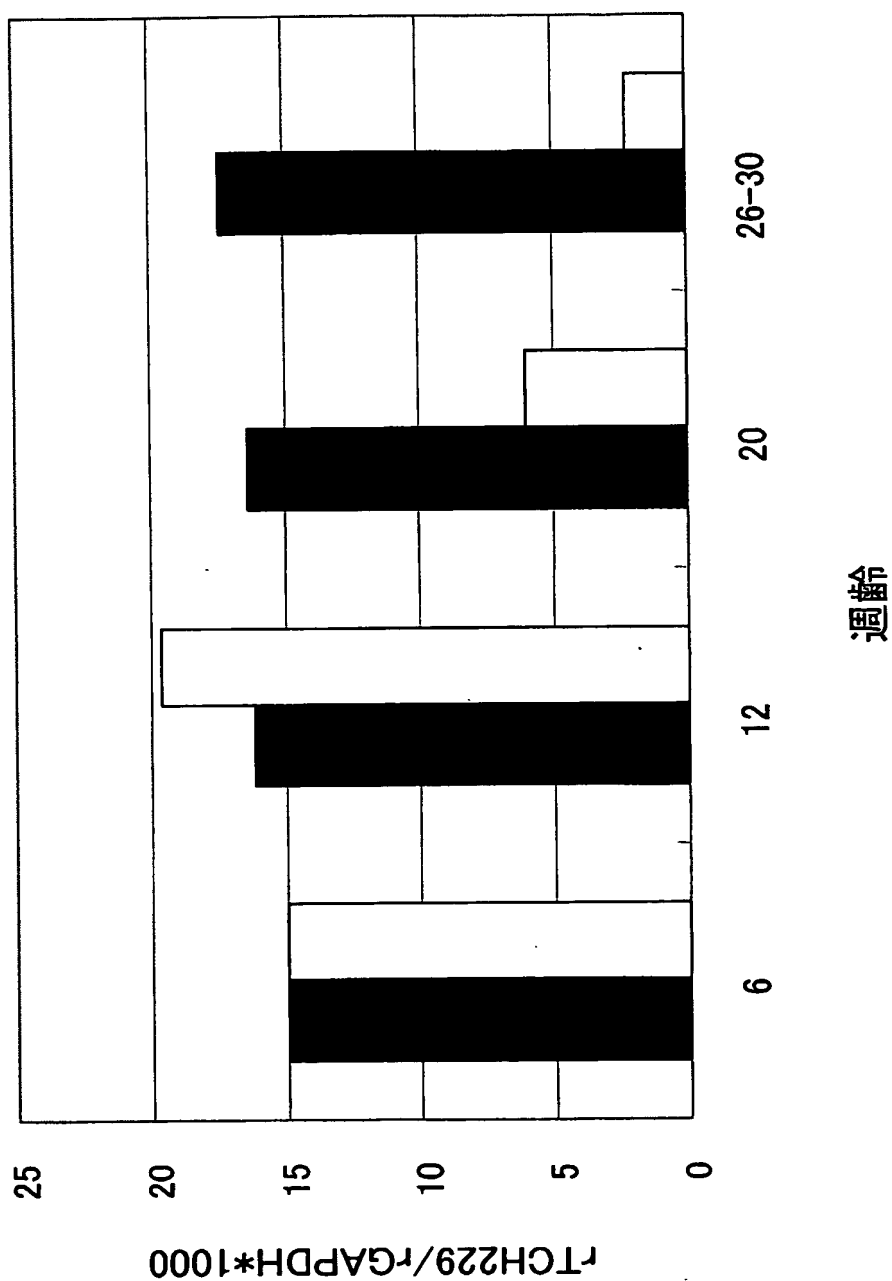
15/17

☒ 1 5



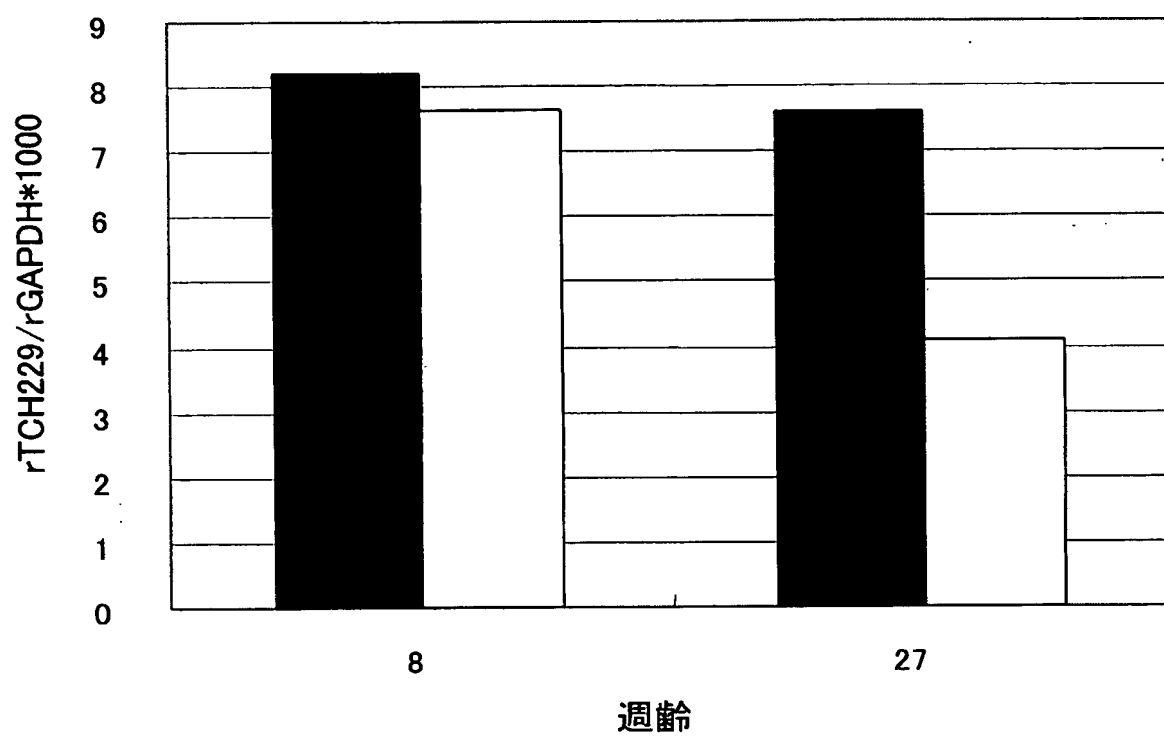
16/17

図 1 6



17/17

☒ 1 7



## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and its DNA

<130> 3030W00P

<150> JP 2002-061133

<151> 2002-03-06

<150> JP 2002-098852

<151> 2002-04-01

<150> JP 2002-184883

<151> 2002-06-25

<160> 84

<210> 1

<211> 724

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Lys Ser Ala Lys Gly Ile Glu Asn Leu Ala Phe Val Pro Ser Ser

5

10

15

Pro Asp Ile Leu Arg Arg Leu Ser Ala Ser Pro Ser Gln Ile Glu Val

20

25

30

Ser Ala Leu Ser Ser Asp Pro Gln Arg Glu Asn Ser Gln Pro Gln Glu

35

40

45

Leu Gln Lys Pro Gln Glu Pro Gln Lys Ser Pro Glu Pro Ser Leu Pro

50

55

60

Ser Ala Pro Pro Asn Val Ser Glu Glu Lys Leu Arg Ser Leu Ser Leu

65

70

75

80

Ser Glu Phe Glu Glu Gly Ser Tyr Gly Trp Arg Asn Phe His Pro Gln

85

90

95

Cys Leu Gln Arg Cys Asn Thr Pro Gly Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys

100

105

110

Leu Leu Ala Val Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile

115

120

125

Ser Ile Ser Thr Val Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr

130

135

140

Gly Leu Ile Ser Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Leu Leu Ser Leu

145

150

155

160

Phe Val Ser Phe Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala

165

170

175

Phe Ala Ala Phe Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro

180

185

190

Gln Phe Phe Ser Gly Glu Tyr Lys Leu Gly Ser Leu Phe Glu Asp Thr

195

200

205

Cys Val Thr Thr Arg Asn Ser Thr Ser Cys Thr Ser Ser Thr Ser Ser

210

215

220

Leu Ser Asn Tyr Leu Tyr Val Phe Ile Leu Gly Gln Leu Leu Leu Gly

225

230

235

240

Ala Gly Gly Thr Pro Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Leu Asp Asp

245

250

255

Ser Val Pro Thr His Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Thr Gly Tyr Ala

260

265

270

Met Ser Ile Leu Gly Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gln Leu

275

280

285

Leu Thr Ile Tyr Ile Asp Val Ala Met Gly Glu Ser Thr Asp Val Thr

290

295

300

Glu Asp Asp Pro Arg Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu

305                      310                      315                      320  
Ser Trp Ile Phe Ala Trp Ser Leu Ile Ile Pro Phe Ser Cys Phe Pro  
                         325                      330                      335  
Lys His Leu Pro Gly Thr Ala Glu Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln  
                         340                      345                      350  
Ala His Gln Ser Asn Ser Asn Ala Asp Val Lys Phe Gly Lys Ser Ile  
                         355                      360                      365  
Lys Asp Phe Pro Ala Ala Leu Lys Asn Leu Met Lys Asn Ala Val Phe  
                         370                      375                      380  
Met Cys Leu Val Leu Ser Thr Ser Ser Glu Ala Leu Ile Thr Thr Gly  
385                      390                      395                      400  
Phe Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr  
                         405                      410                      415  
Ser Ser Phe Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala  
                         420                      425                      430  
Ala Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Phe Leu Val Ser Lys Phe Arg Met  
                         435                      440                      445  
Thr Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Phe Thr Ser Gly Val Ala  
                         450                      455                      460  
Leu Thr Leu Ser Phe Val Phe Met Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Glu Pro  
465                      470                      475                      480  
Phe Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Leu Gly Asn  
                         485                      490                      495  
Leu Ile Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Ser Arg Ser Tyr Tyr  
                         500                      505                      510  
Tyr Pro Val Cys Gly Asp Gly Val Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala  
                         515                      520                      525  
Gly Cys Ser Asn Pro Val Ala His Arg Lys Pro Lys Val Tyr Tyr Asn  
                         530                      535                      540

Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Thr Glu Ile Thr Ser Thr Ala Glu Thr  
545 550 555 560  
Phe Gly Phe Glu Ala Lys Ala Gly Lys Cys Glu Thr His Cys Ala Lys  
565 570 575  
Leu Pro Ile Phe Leu Cys Ile Phe Phe Ile Val Ile Ile Phe Thr Phe  
580 585 590  
Met Ala Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His  
595 600 605  
Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Gly Ile Gln Phe Met Val Leu Arg Leu  
610 615 620  
Leu Gly Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Phe Thr Ile Asp Ser  
625 630 635 640  
Thr Cys Ile Leu Trp Asp Ile Asn Asp Cys Gly Ile Lys Gly Ala Cys  
645 650 655  
Trp Ile Tyr Asp Asn Ile Lys Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser  
660 665 670  
Val Thr Cys Lys Val Ile Thr Met Phe Phe Asn Gly Phe Ala Ile Phe  
675 680 685  
Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Ala Thr Asp Val Ser Phe His Lys Glu  
690 695 700  
Asn Ala Val Val Thr Asn Val Leu Ala Glu Gln Asp Leu Asn Lys Ile  
705 710 715 720  
Val Lys Glu Gly

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2172

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atgaagagcg ccaaaggtat tgagaacttg gctlllgtcc cctccagccc agacatccig 60  
cgccgcttgt ctgcgtcgcc ctcccaaate gaagtctctg ccttgctctc tgacccccaa 120  
agagagaatt ctgagccaca ggagcttcag aagccccagg agccccagaa gtcacccgag 180  
ccaatctctg cttcagcccc tcccaatgtc tccgaagaga agctccggic acigtctgtg 240  
tccgagtttg aggaggggtc ttacggcigg aggaacttcc atcttcaatg tctccagcgc 300  
tgcaacacac ctggaggctt tctgcttcac tactgcctct tggccgtcac gcaaggtatt 360  
glagttaatg gcctagtaaa tattagcatt tccactgttg agaagcgta tgaaatgaag 420  
agttccctga ctggcctgat ttcatcaagc tacgatatit cattctgttt gttgtcttta 480  
tttgtatcat tctllgggtga aagaggacat aagccgagat ggcttgcatt tgcagccitt 540  
atgatlggac tgggagcact tgtattctca ttgccacaat ttttcagtgg agaataataa 600  
ttggggctct tttttgaaga cacttgtgta acaacaagga atagcaccag ttgtacatct 660  
tcaacttctt cactttctaa ctacttgtat gtccttcatc tgggacaact attgctgggg 720  
gcaggaggaa cttctcttta tactctggga acagccttcc ttgatgattc tgtgcccaca 780  
cacaagcttt ctctctatat aggaaccggt tatgctatgt caatcttagg ccttgcattt 840  
ggctatgtat tgggaggaca actgctaacc atatacatig atgttgcatt gggagaaagc 900  
actgatgtca ctgaggatga tccgcgaagg ttgggagctt ggtggattgg gtttcttcta 960  
tcatggatct ttgcttggic ttttaataata ctttttctt gctttccaaa acatttacca 1020  
ggtacagcag aaattcaagc tggaaaaact tcccaggctc atcagagtaa tagtaatgca 1080  
gatgtgaaat ttggaaaaag tattaaagat ttccagctg ctctaaagaa ttigtatgaag 1140  
aatgctgict ttatgtgttt agttctatca acttcttcag aagccttaat tactactgga 1200  
tttgctacat ttttacctaa atttatagaa aatcaattcg gattgacatc cagcttcgca 1260  
gctactcttg gaggggctgt ttttaattcct ggagctgctc tcgggtcaaat tttaggtggc 1320  
ttccttgttt caaaattcag aatgacatgt aaaaacacaa tgaagtttgc actgttcaca 1380  
tctggagttg cacttacgct gagttttgta ttatgtatg ccaaagtga aaatgagcca 1440  
tttgctggtg tatctgaatc atataatggg actggagaat tgggaaactt gatagcccct 1500  
tgtaatgcca attgtaactg ttccgcatca tattattatc ctgtctgttg agatggagtc 1560  
caatatTTTT ctccctgctt tgcaggctgt tcaaaccag ttgcacacag gaagccaaag 1620  
gtatattaca actgttccig tattgaaagg aaaacagaaa taacatccac tgcagaaact 1680  
tttggttttg aagctaaagc tggaaaatgt gaaactcatt gtgcgaaact gcccatattc 1740



ctttgcattt tctttaattgt aattatattt acctttatgg cgggtactcc tataactgtg 1800  
tctatcctaa ggigtgttaa tcacagacaa cggtccttag ccttgggaat acaatttatg 1860  
gtccttcgat tattaggaac aattcctgga ccaattatat ttggtttcac aatagacagc 1920  
acaigtattc ttggggatat aaatgattgt ggaattaaag gagcttgctg gatttatgat 1980  
aacatcaaga tggcccalat gctagtagcc ataagtgtaa ctigttaaagt tatcaccaatg 2040  
ttcttcaatg gatttgcaat ctttttgtat aaaccacctc catcagccac agatgtgtca 2100  
tttcataaag agaatgcagt tgtgactaat gttttagcag aacaggatct caacaaaata 2160  
gtaaaagaag gg 2172

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

ccatcctaatacgcactcactatagggc

27

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

aaaccaatcaccaagctcccaacc

26

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

actcactata gggctcgagc ggc

23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

ccaatccacc aagctcccaa ccatac

25

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

gttcctccag ccgtaagacc cctcctca

28

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

cggagacatt gggaggggct gaagg

25

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

tgggagctt ggtggattgg gtttcttc

28

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

gggactggag aattgggaaa ctgatagc

29

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

&lt;400&gt; 11

cacgggggcg ctgtcacctg

20

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 12

atcgaggtaa attttccagg tgtaa

25

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 13

agggacctgg ctctgctgct ctg

23

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 14

aacagtcttc tcttttccca ttca

25

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

gtaaaacgac ggccag

16

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

caggaaacag ctatgac

17

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 17

ctgggaacag ccttcttga tgat

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 18

cagcaagctc ctttaattcc acaa

24

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

tgggaggaca actgctaacc a

21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

atcgcggtac atcctcagtg

20

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 21

cattgatgtt gctatgggag aaagcactga tg

32

<210> 22

<211> 782

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

aagtcacccg agccatctct gccttcagcc cctcccaatg tctccgaaga gaagctccgg 60  
tcactgtcgc tgtccgagtt tgaggagggg tcttacggct ggaggaactt ccatcctcaa 120  
tgtctccagc gctgcaacac acctggaggg tttctgcttc actactgcct ctggccgctc 180  
acgcaaggta ttgtagttaa tggcctagta aatattagca tticcactgt tgagaagcgt 240  
tatgaaatga agagtccct gactggcctg atttcatcaa gctacgatat ttcaattctgt 300  
ttgttgtctt tatttgtatc attctttggt gaaagaggac ataagccgag atggcttgca 360  
tttgcagcct ttatgattgg actgggagca ctigtattct catggccaca attttcagt 420  
ggagaatata aattggggtc tctttttgaa gacacttgig taacaacaag gaatagcacc 480  
agttgtacat ctcaacttc ttcaatttct aactacttgt atgtcttcat ctggggacaa 540  
ctattgctgg gggcaggagg aactcctctt tatactctgg gaacagcctt tcttgatgat 600  
tctgtgcca cacacaagtc ttctctctat ataggaaccg gttatgctat gtcaatctta 660  
ggccctgcta ttggctatgt attgggagga caactgctaa ccatatacat tgatgttgct 720  
atgggagaaa gcactgatgt cactgaggat gatccgcgat ggttgggagc ttggtggatt 780  
gg 782

<210> 23

<211> 485

<212> DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 23

```

ctaacgcccc cgctcagcgc tctgcgctcc agacagctgc gagctggagt aggaagggtc   60
aggcgggtggc ggagagtgcg ctggaggctg gagggccagg aggcgggaag ctccccgcac   120
gggggcgctg tcacctgcct gtgggaggag ccagagaggg acctggcctt gcctgctga   180
agcaccggag tcgggagaac ccatccagac atgaagagcg ccaaaggtaa tgagaacttg   240
gctttgtcc cctccagccc agacatcctg cgccgcttgt ctgcgtcgcc ctcccaaatc   300
gaagtcctg cctgtctc tgaccccaa agagagaatt ctccagccaca ggagcttcag   360
aagccccagg agccccagaa gtcaccagag ccatctctgc ctccagcccc tcccaatgtc   420
tccgaagaga agctccggtc actgtcgtg tccgagtttg aggaggggtc ttacggctgg   480
aggaa                                           485

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 792

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 24

```

gggactggag aattgggaaa ctgatagcc ccttgtaaag ccaattgtaa ctgttcgca   60
tcatattatt atcctgtctg tggagatgga gtccaatatt tttctccctg ctgtgcaggc   120
tgttcaaacc cagttgcaca caggaagcca aaggtaatt acaactgttc ctgtattgaa   180
aggaaaacag aaataacaac cactgcagaa acttttgggt ttgaagctaa agctggaaaa   240
tgtgaaactc attgtgcgaa actgcccata ttcccttgca tttctttat tgaattatt   300
tttaccttta tggccggtac tctataact gtgtctatcc taagggtgtg taatcacaga   360
caacgggtccc tagccttggg aatacaattt atggctctc gattattagg aacaattcct   420
ggaccaatta tatitgggtt cacaatagac agcacatgta ttctttggga tataaatgat   480
tgtggaatta aaggagcttg ctggatttat gataacatca agatggccca tatgctagta   540
gccataagtg ttacttgtaa agttatcacc atgttcttca atggatttgc aatctttttg   600
tataaaccac ctccatcagc cacagatgtg tcatlctata aagagaatgc agttgtgact   660
aatgttttag cagaacagga tctcaacaaa atagtaaaag aagggtgaaa tgggaaaaga   720

```



gaagacigtt ttacacctgg aaaatttacc tcgattttta agaacacaca ttgccatggc 780  
aggattatct at 792

<210> 25

<211> 2251

<212> DNA

<213> Human

<400> 25

agggacctgg ctctgctgct ctgaagcacc ggagtcggga gaacccatcc agacatgaag 60  
agcgccaaaag gtattgagaa ctiggcittt gicccctcca gccagacat cctgcgccgc 120  
ttgtctgct cgcctccca aatcgaagtc tctgccttgi cctctgaccc ccaaagagag 180  
aatctcagc cacaggagct tcagaagccc caggagcccc agaagtcacc cgagccatct 240  
ctgccctcag cccctcccaa tgctccgaa gagaagctcc ggtcactgtc gctgtccgag 300  
tttgaggagg ggtcttacgg ctggaggaac ttccatctc aatgtctcca gcgtgcaac 360  
acacctggag gctttctgct tctactctgc ctcttggccg tcacgcaagg tattgtagtt 420  
aatggcctag taaatattag cattccact gttgagaagc gttatgaaat gaagagtcc 480  
ctgactggcc tgatttcac aagctacgat attcattct gtttgtgtc tttatttgta 540  
tcattctttg gtgaaagagg acataagccg agatggcttg catttgcagc ctttatgatt 600  
ggactgggag cacttgtatt ctcatggcca caattttca gtggagaata taaattgggg 660  
tctctttttg aagacacttg tgaacaaca aggaatagca ccagttgtac atcttcaact 720  
tcttcacttt ctaactactt gtatgtcttc atcttgggac aactattgct gggggcagga 780  
ggaactctc tttatactct gggaacagcc ttcttgaig attctgtgcc cacacacaag 840  
tcttctctct atataggaac cggttatgct atgtcaatct taggcccctgc tattggctat 900  
gtattgggag gacaactgct aaccatatac attgaigtg ctatgggaga aagcactgat 960  
gtcactgagg atgatccgcg atggttggga gcttggtgga ttgggtttct tctatcatgg 1020  
atctttgctt ggtctttaat aatacctttt tcttgccttc caaaacattt accaggtaca 1080  
gcagaaattc aagctggaaa aacttcccag gctcatcaga gtaatagtaa tgcagatgtg 1140  
aaatttggaa aaagtattaa agattttcca gctgtcttaa agaatttgat gaagaatgct 1200  
gtctttatgt gtttagttct atcaacttct tcagaagcct taattactac tggatttgct 1260

acatttttac ctaaaattat agaaaatcaa ttccgattga catccagctt cgcagctact 1320  
 ctggaggagg ctgttttaat tcctggagct gctctcggtc aaattttagg tggcttcctt 1380  
 gtttcaaaat tcagaatgac atgtaaaaac acaatgaagt ttgcactggt cacatctgga 1440  
 gtgcactta cgcagagitt tgtatttatg tatgccaaat gtgaaaatga gccatttgct 1500  
 ggtglatctg aatcatataa tgggactgga gaattgggaa acttgatagc cccttgtaat 1560  
 gccaatgta actgttcgcg atcatattat tatcctgtct gtggagatgg agtccaatat 1620  
 tttctccct gctttgcagg ctgttcaaac ccagttgcac acaggaagcc aaaggatat 1680  
 tacaactggt cctgtattga aaggaaaaca gaaataacat ccactgcaga aacttttgg 1740  
 ttgaagcta aagctggaaa atgtgaaact cattgtgcga aactgcccc attcctttgc 1800  
 atttcttta ttgtaattat ttttaccttt atggccggta ctctataac tglgtctatc 1860  
 ctaagggtg ttaatcacag acaacgggtc ctagccttgg gaatacaatt tatggtcctt 1920  
 cgattattag gaacaattcc tggaccaatt atatttgggt tcacaataga cagcacatgt 1980  
 attcittggg atataaatga ttgtggaatt aaaggagctt gctggattta tgataacatc 2040  
 aagatggccc atatgctagt agccataagt gttacttgta aagttaacac catgttcttc 2100  
 aatggatttg caatcttttt gtataaacca cctccatcag ccacagatgt gtcatttcat 2160  
 aaagagaatg cagttgtgac taatgtttta gcagaacagg atctcaaca aatagtaaaa 2220  
 gaagggtgaa atgggaaaag agaagactgt t 2251

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 722

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 26

Met Gln Gly Ser Lys Gly Ile Glu Asn Pro Ala Phe Val Pro Ser Ser

5

10

15

Pro Gly Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gln Val Glu Val

20

25

30

Ser Ala Val Ala Ser Arg Asn Gln Asn Gly Gly Ser Gln Pro Arg Glu

35

40

45

16/52

Ser Glu Glu Pro Gln Lys Ser Thr Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ser Asn  
50 55 60  
Pro Pro Ala Ser Asp Glu Pro Pro Gly Ser Gln Leu Ser Glu Leu Glu  
65 70 75 80  
Glu Gly Pro Cys Gly Trp Arg Gly Phe His Pro Gln Cys Leu Gln Arg  
85 90 95  
Cys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys Leu Leu Ala Leu  
100 105 110  
Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile Ser Ile Ser Thr  
115 120 125  
Ile Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser  
130 135 140  
Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Val Leu Ser Leu Phe Val Ser Phe  
145 150 155 160  
Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala Phe Ala Ser Phe  
165 170 175  
Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro His Phe Phe Ser  
180 185 190  
Gly Arg Tyr Glu Leu Gly Ser Ile Phe Glu Asp Thr Cys Leu Thr Arg  
195 200 205  
Asn Ser Thr Arg Cys Ser Ser Ser Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Phe  
210 215 220  
Tyr Val Phe Val Leu Gly Gln Leu Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Pro  
225 230 235 240  
Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Ile Asp Asp Ser Val Pro Thr His  
245 250 255  
Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Gly Tyr Ser Met Ser Ile Leu Gly  
260 265 270  
Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gln Leu Leu Thr Met Tyr Ile

275	280	285
Asp Ile Ala Met Gly Gln Ser Ser Asp Leu Thr Glu Asp Asp Pro Arg		
290	295	300
Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu Ala Trp Leu Phe Ala		
305	310	315
Trp Ser Leu Ile Met Pro Phe Ser Cys Phe Pro Lys His Leu Pro Gly		
325	330	335
Thr Ala Lys Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln Thr His Gln Asn Asn		
340	345	350
Ser Thr Ser Phe Gln His Thr Asp Glu Asn Phe Gly Lys Ser Ile Lys		
355	360	365
Asp Phe Pro Thr Ala Val Lys Asn Leu Met Arg Asn Thr Val Phe Ile		
370	375	380
Cys Leu Val Leu Ser Thr Thr Ser Glu Ala Leu Ile Thr Thr Gly Phe		
385	390	395
Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr Ser		
405	410	415
Ser Phe Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala Ala		
420	425	430
Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Val Leu Val Ser Lys Phe Lys Met Lys		
435	440	445
Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Cys Thr Ser Gly Val Ala Leu		
450	455	460
Val Leu Ser Phe Val Phe Ile Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Glu Pro Phe		
465	470	475
Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Met Gly Asn Leu		
485	490	495
Thr Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Leu Arg Ser Tyr Tyr Tyr		
500	505	510

18/52

Pro Leu Cys Gly Ser Asp Gly Ile Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala  
515 520 525

Gly Cys Leu Asn Ser Val Ser Asn Arg Lys Pro Lys Val Tyr Tyr Asn  
530 535 540

Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Ile Thr Ser Thr Ala Glu Ser Thr Asp  
545 550 555 560

Phe Glu Ala Lys Ala Gly Lys Cys Arg Thr Arg Cys Ser Asn Leu Pro  
565 570 575

Ile Phe Leu Gly Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Phe Thr Phe Met Ala  
580 585 590

Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His Arg His  
595 600 605

Arg Ser Leu Ala Leu Gly Val Gln Phe Met Leu Leu Arg Leu Leu Gly  
610 615 620

Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Val Ile Ile Asp Ser Thr Cys  
625 630 635 640

Val Leu Trp Asp Val Asn Glu Cys Gly Ile Lys Gly Ala Cys Trp Ile  
645 650 655

Tyr Asp Asn Ile Lys Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser Val Thr  
660 665 670

Cys Lys Val Ile Thr Ile Phe Phe Asn Gly Leu Ala Ile Val Leu Tyr  
675 680 685

Lys Pro Pro Pro Pro Gly Thr Glu Val Ser Phe Gln Ser Gln Asn Val  
690 695 700

Ile Val Ser Thr Ile Ser Val Glu Glu Asp Leu Asp Lys Ala Glu Asn  
705 710 715 720

Glu Gly

&lt;211&gt; 2166

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 27

atgcagggct ccaaaggaat agagaacccg gctttcgtcc cticcagccc aggcacccca 60  
cgccgtgcgt ctgcttcgcc ctcccaggig gaggtctctg ctgtggccic caggaatcag 120  
aatgggggtt cgcagcctcg ggaatctgag gagcctcaga agtcaactga gccatccccg 180  
ccttcttcga atccccagc ttctgatgag ccgccggggt cacagctaag cgagcttgag 240  
gagggacctt gcgggtggag gggctttcac cccagtgic tccagcgcig caacaccccc 300  
caaggctttt tgccttacta ctgtctctta gccctaacgc aaggtattgt agtaaacggc 360  
ctggtaaaca ttagcatctc caccattgag aagcgttatg aaatgaaaag ctactgaca 420  
ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgttgtt tatctctatt tgtgtctttc 480  
tttggggaga gaggacacaa acctcgctgg ctgcctttg catcctttat gataggcctg 540  
ggagcgcctg tgttttctt accacacttc ttcagtggaa gatatgaact gggatccatt 600  
tttgaagata cgtgcttaac aaggaacagt accagatgtt catcttcaac ctccctgctt 660  
tctaactact tctatgtctt tgtcctggga caattgttgc tggggaccgg agggactccg 720  
ctctacacce tggggacagc ctttatigat gactctgtgc ccacacacaa atcttctctc 780  
tatataggta ttggctattc tatgtcaatc ctaggccctg ccatlggata tgtgttgggt 840  
ggacagctgt tgacaatgta catlgatatt gctatgggac aaagttcgga tctgactgag 900  
gatgatcccc ggtggctggg ggcttgggtg atlggattcc ttttagcttg gctctttgct 960  
tggcttttga taatgccctt ctccigtitt cccaagcatt taccagggac agcaaaaatt 1020  
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctctcttcca acatacggat 1080  
gaaaattttg gaaaaagtat taaagatttt ccaactgctg taaagaattt gatgaggaat 1140  
acagtcttta tatgtttagt tctatcaact acttctgaag catlaattac tacgggattt 1200  
gccacatttt tacttaaat tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctttgcagcc 1260  
actcttggag gggctgtttt aattccctga gctgtctttg gtcaaatctt aggttgtgtt 1320  
cttgtttcaa aattcaaaaat gaagtglaaa aatacaatga agtttgctt atgtacatct 1380  
ggagtagcac ttgtgctgag ttttgtattt atttatgcaa aatgtgaaaa tgagccattt 1440  
gctgggtgtg ctgaatcata taatggaact ggagaaatgg ggaatttgac tgcaccttgt 1500

aatgccaact gcaactgttt gcggtcctac tattacccac tctgtggaag tgaiggaatc 1560  
cagtat:tttt ctccttgctt tgcagggtgt ttaaactcag ttcaaacag gaaacccaag 1620  
gtatattata attgttcctg tatagaaagg aaaatcacct ctactgcaga aagtactgat 1680  
tttgaagcta aagctggaaa atgtagaact cggigtcaa acttgcccat atttcttggc 1740  
atttcttca ttacagttat ctttaccctt atggcaggca ctctataac tgtgtctata 1800  
ttaagggtgt ttaalcacag acatcggtct ctagcattgg gactgcagtt catgcttctt 1860  
cgattgctag gtacaatacc tgggccaatt atatttggtg tcataataga cagcacaagt 1920  
gttctgtggg atgtcaatga atgtggaata aaaggagcat gttggattta tgataacatc 1980  
aagatggcac atatgtcgtt agclataagt gttacttgta aagttaacac catattcttc 2040  
aatggacttg cgattgttct ctataaacca ccgccccag gaacagaggt atcatttcaa 2100  
agtcagaatg tcattgtgtc tactatttcg gtcgaagagg atctagacaa agcagaaaaat 2160  
gaaggg 2166

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

cgagcttgag gagggacctt gcggg

25

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

21/52

atccaacatg ctccttttat tcc

23

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 30

aggcgagcca gcgaggtttg tgtcc

25

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 31

gatgcaaagg cgagccagcg aggtt

25

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 32

aactgtttgc ggtcctacta ttac

24



<210> 33

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

ggatgtcaat gaatgtggaa taaaaggag

29

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

cctttcttga ccatgcaggg ctccaa

26

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

agccagttcc caaagcaatc tcttc

25

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

atgcagggct ccaaaggaat agag

24

<210> 37

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

tcacccttca ttttctgctt tgtctag

27

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

cagtaccaga tgttcatcct caacc

25

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

actgaggatg atccccggig gctg

24

<210> 40

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

tttattccac attcattgac atcccacag

29

<210> 41

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

gataactgta atgaagaaaa tgccaagaaa

30

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

gcaatcicct cctccitttc acccttcat

29

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

cagcccaggc accccacgcc

20

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 44

aaggcgagcc agcgaggttt gt

22

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

gaagtcaact gagccatccc c

21

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

agctcgctta gctgtgaccc

20

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 47

tcttcgaatc ccccagcttc tgatga

26

<210> 48

<211> 1737

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 48

cgagcttgag gagggacctt gcgggtggag gggctttcac ccccagtgtc tccagcgctg 60  
caacaccccc caaggctttt tgcctcacta ctgtctctta gccctaacgc aaggctattgt 120  
agtaaacggc ctggtaaaca ttagcatctc caccattgag aagcgtaatg aaatgaaaag 180  
ctcactigaca ggcttgalat catcgagcta cgacatctcc ttttgttgtt tatctctatt 240  
tgtgtctttc tttggggaga gaggacacaa acctcgctgg ctgccttttg catcctttat 300

galaggccig ggagcgctgg tgttttcctt accacacttc ttcagtggaa gatatgaact 360  
gggatccatt ttgaagata cgtgcctaac aaggaacagt accagatgtt catcttcaac 420  
ctccctgctt tctaactact tctatgtctt tgtcctggga caattgttgc tggggaccgg 480  
agggaciccg cctacacccc tggggacagc ctttatgat gactctgtgc ccacacacaa 540  
atcttctctc tatataggta ttggctattc tatgtcaatc ctaggccctg ccatggata 600  
tgtgttgggt ggacagcgtt tgacaatgta cattgatatt gctatgggac aaagttcgga 660  
tctgactgag gatgatcccc ggtggctggg ggcttgggtg attggattcc ttttagcttg 720  
gctctttgct tggcttttga taatgccttt ctccgttttt cccaagcatt taccagggac 780  
agcaaaaatt caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctctcttcca 840  
acatacggat gaaaattttg gaaaaagtat taaagatttt ccaactgctg taaagaattt 900  
gatgaggaat acagtcctta tatgtttagt tctatcaact acttctgaag catlaattac 960  
tacgggattt gccacatttt tacttaaat tatagaaaat caatttggat tgacatcgag 1020  
ctttgcagcc actcttggag gggctgtttt aattccttga gctgctcttg gtcaaatctt 1080  
aggtgggtgt ctgttttcaa aattcaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcctt 1140  
atgtacatct ggagtagcac ttgtgctgag ttttgtattt attatgcaa aatgtgaaaa 1200  
tgagccattt gctgggtgtg ctgaatcata taatggaact ggagaaatgg ggaatttgac 1260  
tgcaccttgt aatgccaact gcaactgttt gcggctctac tattaccac tctgtggaag 1320  
tgatggaatc cagtattttt ctccctgctt tgcaggttgt ttaaactcag ttccaacag 1380  
gaaaccaag gtatattata attgttccctg tatagaaagg aaaatcactt ctactgcaga 1440  
aagtacgat ttgaagcta aagctggaaa atgtagaact cgggtgttcaa acttgcccat 1500  
atttcttggc atttcttcca ttacagttat ctttacctt atggcaggca ctctataac 1560  
tgtgtctata ttaagggtgt ttaatcacag acatcggctc ctagcattgg gagtgcagtt 1620  
catgcttctt cgattgctag gtacaatacc tgggccaatt atatttgggt tcataataga 1680  
cagcacatgt gtctgttggg atgtcaatga atgtggaata aaaggagcat gttggat 1737

<210> 49

<211> 532

<212> DNA

<213> Mouse

&lt;400&gt; 49

```

gaaccttict tgaccatgca gggctccaaa ggaatagaga acccggtttt cgtcccttcc 60
agcccaggca cccacgccc tgcgtctgct tcgccctccc aggtggaggt ctctgctgtg 120
gccctccagga atcagaatgg gggttcgcag cctcggaat ctgaggagcc tcagaagica 180
actgagccat ccccgccctt ttccaatccc ccagcttctg atgagccgcc ggggtcacag 240
ctaagcgagc ttgaggaggg accttgcggg tggaggggct ttacacccca gtgtctccag 300
cgctgcaaca cccccaagg ctttttgcct cactactgtc tcttagccct aacgcaaggt 360
attgtagtaa acggcctggt aaacattagc atctccacca ttgagaagcg ttatgaaatg 420
aaaagctcac tgacaggcct gatatcactg agctacgaca tctccttttg tgtgttatct 480
ctatttgtgt ctttctttgg ggagagagga cacaacctc gctggctcgc ct 532

```

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 273

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 50

```

ggatgtcaat gaatgtggaa laaaaggagc atgttggatt tatgataaca tcaagatggc 60
acatatgctg gtagctataa gtgttacttg taaagttatc accatatctt tcaatggact 120
tgcgattgtt ctclataaac caccgcccc aggaacagag gtaicatttc aaagtcagaa 180
tgtcattgtg tctactatit cggtcgaaga ggaatagac aaagcagaaa atgaagggtg 240
aaaaggagga ggagattgct ttgggaactg gct 273

```

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 2169

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 51

```

atgcagggt ccaaaggaat agagaacccg gcttctgtcc ctccagccc aggcacccca 60
cgccgtgcgt ctgcttcgcc ctcccagggt gaggctctg ctgtggcctc caggaatcag 120

```

aatgggggtt cgcagccicg ggaatctgag gagcctcaga agtcaactga gccatccccg 180  
ccctcttcga atccccagc ttctgatgag cgcgggggt cacagctaag cgagcttgag 240  
gagggacctt gcgggtggag gggctttcac cccagtgic tccagcgctg caacaccccc 300  
caaggctttt tgccttacta ctgtctctta gccctaacgc aaggtattgt agtaaacggc 360  
ctggtaaaca ttagcatctc caccattgag aagcgttatg aaatgaaaag ctactgaca 420  
ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgttgtt tatctctatt tgtgtctttc 480  
tttggggaga gaggacacaa acctcgctgg ctgcctttg catcctttat gataggcctg 540  
ggagcgctgg tgttttcctt accacacttc ttcagtggaa gatatgaact gggatccatt 600  
tttgaagata cgtgcttaac aaggaacagt accagatgtt catcttcaac ctccctgctt 660  
tctaactact tctatgtctt tglccctggga caattgttgc tggggaccgg agggactccg 720  
ctctacacce tggggacagc ctttatlgat gactctgtgc ccacacacaa atcttctctc 780  
tatataggta ttggctattc tatgtcaatc ctaggccctg ccatlggata tgtgtlgggt 840  
ggacagctgt tgacaatgta cattgatatt gctatgggac aaagttcgga tctgactgag 900  
gatgatcccc ggtggctggg ggctlgggtg attggattcc ttttagcttg gctctttgct 960  
tggcttttga taatgccctt ctctgtttt cccaagcatt taccagggac agcaaaaatt 1020  
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta cticcttcca acatacggat 1080  
gaaaattttg gaaaaagtat taaagatttt ccaactgctg taaagaattt gatgaggaat 1140  
acagtcttla tatgtttagt tctatcaact acttctgaag cattaattac tacgggattt 1200  
gccacatttt tacctaaatt tatagaaaat caattlggat tgacatcgag ctltgcagcc 1260  
actcttggag gggctgtttt aattccctgga gctgtctctg gtcaaactctt aggtgggtgtt 1320  
cttgtttcaa aattcaaaat gaagtgtaaa aalacaatga agttlgtctt atgtacatct 1380  
ggagtagcac ttgtgtgag ttttgtattt atttatgcaa aatgtgaaa tgagccattt 1440  
gctgggtgtgt ctgaatcata taatggaact ggagaaatgg ggaatttgac tgcacctgtt 1500  
aatgccaaact gcaactgttt gcggctctac tattaccac tctgtggaag tgatggaatc 1560  
cagtattttt ctccctgctt tgcaggttgt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaag 1620  
gtatattata attgttctg tatagaaagg aaaatcactt ctactgcaga aagtactgat 1680  
tttgaagcta aagctggaaa atgtagaact cgggtgtcaa actlgtccat atttctlgtc 1740  
atttcttca ttacagttat ctltacctt atggcaggca ctctataac tgtgtctata 1800  
ttaagggtgt tlaatcacag acatcggctt ctagcattgg gagtgcagtt catgtctctt 1860



30/52

cgattgctag giacaatacc tgggccaatt atatttgggtg tcataataga cagcacaigt 1920  
gttctgtggg atgtcaatga atgtggaata aaaggagcat gtiggattta tgataacatc 1980  
aagatggcac atatgctggg agctataagt gttacttgta aagtatcac catattcttc 2040  
aatggacttg cgattgttct ctataaacca ccgccccag gaacagaggt atcatttcaa 2100  
agtcagaatg tcattgtgtc tactatttcg gtcgaagagg atctagacaa agcagaaaaat 2160  
gaaggggtga 2169

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 724

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 52

Met Gln Gly Ser Lys Gly Val Glu Asn Pro Ala Phe Val Pro Ser Ser  
5 10 15  
Pro Asp Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gln Val Glu Val  
20 25 30  
Ser Ala Val Ala Ser Arg Asn Gln Asn Gly Gly Ser Gln Pro Arg Glu  
35 40 45  
Ser Glu Asp Pro Gln Lys Ser Thr Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ser Thr  
50 55 60  
Leu Pro Ala Ser Asp Glu Pro Pro Gly Ser Gln Leu Ser Glu Leu Glu  
65 70 75 80  
Glu Gly Pro Cys Gly Trp Arg Asn Phe His Pro Gln Cys Leu Gln Arg  
85 90 95  
Cys Asn Asn Pro Lys Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys Leu Leu Ala Leu  
100 105 110  
Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile Ser Ile Ser Thr  
115 120 125  
Ile Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser

31/52

130 135 140  
Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Val Leu Ser Leu Phe Val Ser Phe  
145 150 155 160  
Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala Phe Ala Ser Phe  
165 170 175  
Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro His Phe Phe Ser  
180 185 190  
Gly Arg Tyr Glu Leu Gly Thr Ile Phe Glu Asp Thr Cys Leu Thr Arg  
195 200 205  
Asn Ser Thr Arg Cys Ala Ser Ser Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Phe  
210 215 220  
Tyr Val Phe Val Leu Gly Gln Leu Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Pro  
225 230 235 240  
Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Ile Asp Asp Ser Val Pro Thr His  
245 250 255  
Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Gly Tyr Ser Met Ser Ile Leu Gly  
260 265 270  
Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gln Leu Leu Thr Met Tyr Ile  
275 280 285  
Asp Val Ala Met Gly Gln Ser Ser Asp Leu Thr Glu Asp Asp Pro Arg  
290 295 300  
Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu Ala Trp Leu Phe Ala  
305 310 315 320  
Trp Ser Leu Ile Met Pro Phe Ser Cys Phe Pro Lys His Leu Pro Gly  
325 330 335  
Thr Ala Lys Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln Thr His Gln Asn Asn  
340 345 350  
Ser Thr Ser Phe Gln His Met Asp Glu Asn Phe Gly Lys Ser Ile Lys  
355 360 365

Asp Phe Pro Thr Ala Val Lys Asn Leu Met Arg Asn Thr Val Phe Ile  
370 375 380

Cys Leu Val Leu Ser Thr Thr Ser Glu Ala Leu Val Thr Thr Gly Phe  
385 390 395 400

Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr Ser  
405 410 415

Ser Ile Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala Ala  
420 425 430

Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Val Leu Val Ser Lys Phe Lys Met Lys  
435 440 445

Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Cys Thr Ser Gly Val Ala Leu  
450 455 460

Met Leu Ser Phe Val Phe Ile Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Gly Pro Phe  
465 470 475 480

Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Met Gly Asn Leu  
485 490 495

Thr Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Leu Arg Ser Tyr Tyr Tyr  
500 505 510

Pro Leu Cys Gly Ser Asp Gly Val Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala  
515 520 525

Gly Cys Leu Asn Ser Val Ser Asn Arg Lys Pro Lys Ala Tyr Tyr Asn  
530 535 540

Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Val Asp Ile Thr Ser Thr Ala Glu Ser  
545 550 555 560

Pro Asp Phe Glu Ala Arg Ala Gly Lys Cys Lys Thr Gln Cys Ser Asn  
565 570 575

Leu Pro Ile Phe Leu Gly Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Phe Thr Phe  
580 585 590

Met Ala Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His

595                      600                      605  
 Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Gly Val Gln Phe Met Leu Leu Arg Leu  
 610                      615                      620  
 Leu Gly Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Val Thr Ile Asp Ser  
 625                      630                      635                      640  
 Thr Cys Val Leu Trp Asp Ile Asn Glu Cys Gly Thr Lys Gly Ala Cys  
 645                      650                      655  
 Trp Ile Tyr Asp Asn Ile Arg Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser  
 660                      665                      670  
 Val Thr Cys Lys Val Ile Thr Ile Phe Phe Asn Gly Leu Ala Ile Val  
 675                      680                      685  
 Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Gly Thr Glu Val Ser Phe Gln Ser Gln  
 690                      695                      700  
 Asn Val Val Val Ser Thr Ile Thr Val Glu Glu Asp Leu Asn Lys Ile  
 705                      710                      715                      720  
 Glu Asn Glu Gly

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 2172

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 53

atgcagggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgtcc ctccagccc agacacccca 60  
 cgccgtgcgt ctgcgtcgcc tcccagggtg gaggtctctg ctgtggcctc caggaatcag 120  
 aatgggggtt cgcaacctcg ggaatctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctcct 180  
 ccttcttcga ctctcccagc ttctgatgag ccgccggggt cacagctaag cgagcttgag 240  
 gagggacctt gcgggtggag gaattccac cccagtgctc ttcagcgctg caacaacccc 300  
 aaaggttttc tgccttacta ctgtctctta gccctaacgc aaggtattgt agtaaattggc 360  
 ctagttaaata ttagcatctc caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag ttccctgacc 420

ggccgtgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgtctctgtt tgtgtctttc 480  
 tttagtgaga gaggacacaa acctcgctgg cttagcctttg catcctttat gatcggactg 540  
 ggagcgctgg tgttttcttt accacacttc ttacgtggga gatatgaact gggaaccatt 600  
 ttccaagata ccgtctaac aaggaacagc accagatlgc ctctctcaac ctctctgctt 660  
 tctaactact tctatgtctt tgtcctggga caactgttgc tggggactgg aggaactccg 720  
 ctctacaccc tgggaacggc ctctattgat gactctgtac ccacacacaa atcttctcta 780  
 tataatcggtt ttggctattc tatgtcaatc ctaggcccag ccattggcta tgtgttggga 840  
 ggacagctgt tgacaatgta cattgatgtt gctatgggac aaagttcaga tctgactgag 900  
 gatgatcccc ggtggttggg ggcttgggtg attggattcc ttttagcttg gctctttgct 960  
 tggcttttga taatgccttt ctctgtttt ccaaagcatt taccagggaac agcaaaaatt 1020  
 caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctctcttcca acataaggat 1080  
 gaaaattttg ggaaaagtat taaagatttt ccaactgcctg tgaagaattt gatgaggaat 1140  
 acagtcttta tatgtttagt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt 1200  
 gccacgtttt tacciaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag cattgcggca 1260  
 acacttggag gggctgtttt aattcctgga gctgcctctg gicaaatctt aggttgggtt 1320  
 ctgttttcaa aattcaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct 1380  
 ggagtagcac ttaatgcctg ttttgtattt atttatgcaa aatgtgaaaa tgggccattt 1440  
 gctgggtgtt ctgaatcata taatggaaca ggagagaagg ggaatctgac tgcaccttgc 1500  
 aatgccaaat gcaattgttt gagatccat tattaccac tctgttgaag tgaatggagtc 1560  
 cagtattttt ctccctgctt tgcaggttgt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaaag 1620  
 gcatattata atgttccctg tattgaaagg aaagtcgaca tcacttctac tgcagaaagc 1680  
 cctgattttg aagcaagggc tggaaaaagt aaaactcagt gticaaacct gcccatattt 1740  
 ctggcatctt tcttcatcac tgtgattttt acctttatgg caggtacccc cataactgtg 1800  
 tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg 1860  
 ctcttctggg tgttaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc 1920  
 acgtgtgttc tgtgggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctatgat 1980  
 aacatcagga tggcgcatat gctgggtggct ataagtgtta ctgttaaagt catcaccata 2040  
 ttcttcaatg gacttgcgat agttctctat aaaccaccgc cccaggaac ggaggtatca 2100  
 tticaaagtc agaatgtagt tgtgtcgacg attacagtgg aggaggacct caacaaaata 2160

gagaacgaag ga

2172

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 724

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 54

Met Gln Gly Ser Lys Gly Val Glu Asn Pro Ala Phe Val Pro Ser Ser

5

10

15

Pro Asp Thr Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ser Pro Ser Gln Val Glu Val

20

25

30

Ser Ala Val Ala Ser Arg Asn Gln Asn Gly Gly Ser Gln Pro Arg Asp

35

40

45

Ser Glu Asp Pro Gln Lys Ser Thr Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ser Thr

50

55

60

Leu Pro Ala Ser Asp Glu Pro Pro Gly Ser Gln Leu Arg Glu Leu Glu

65

70

75

80

Glu Gly Pro Cys Gly Trp Arg Asn Phe His Pro Gln Cys Leu Gln Arg

85

90

95

Cys Asn Asn Pro Lys Gly Phe Leu Leu His Tyr Cys Leu Leu Ala Leu

100

105

110

Thr Gln Gly Ile Val Val Asn Gly Leu Val Asn Ile Ser Ile Ser Thr

115

120

125

Ile Glu Lys Arg Tyr Glu Met Lys Ser Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser

130

135

140

Ser Ser Tyr Asp Ile Ser Phe Cys Val Leu Ser Leu Phe Val Ser Phe

145

150

155

160

Phe Gly Glu Arg Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Ala Phe Ala Ser Phe

165

170

175

36/52

Met Ile Gly Leu Gly Ala Leu Val Phe Ser Leu Pro His Phe Phe Ser  
180 185 190  
Gly Arg Tyr Glu Leu Gly Thr Ile Phe Glu Asp Thr Cys Leu Thr Arg  
195 200 205  
Asn Ser Thr Arg Cys Ala Ser Ser Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Phe  
210 215 220  
Tyr Val Phe Val Leu Gly Gln Leu Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Pro  
225 230 235 240  
Leu Tyr Thr Leu Gly Thr Ala Phe Ile Asp Asp Ser Val Pro Thr His  
245 250 255  
Lys Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Gly Tyr Ser Met Ser Ile Leu Gly  
260 265 270  
Pro Ala Ile Gly Tyr Val Leu Gly Gly Gln Leu Leu Thr Met Tyr Ile  
275 280 285  
Asp Val Ala Met Gly Gln Ser Ser Asp Leu Thr Glu Asp Asp Pro Arg  
290 295 300  
Trp Leu Gly Ala Trp Trp Ile Gly Phe Leu Leu Ala Trp Leu Phe Ala  
305 310 315 320  
Trp Ser Leu Ile Met Pro Phe Ser Cys Phe Pro Lys His Leu Pro Gly  
325 330 335  
Thr Ala Lys Ile Gln Ala Gly Lys Thr Ser Gln Thr His Gln Asn Asn  
340 345 350  
Ser Thr Ser Phe Gln His Met Asp Glu Asn Phe Gly Lys Ser Ile Lys  
355 360 365  
Asp Phe Pro Thr Ala Val Lys Asn Leu Met Arg Asn Thr Val Phe Ile  
370 375 380  
Cys Leu Val Leu Ser Thr Thr Ser Glu Ala Leu Val Thr Thr Gly Phe  
385 390 395 400  
Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Ile Glu Asn Gln Phe Gly Leu Thr Ser

37/52

405	410	415
Ser Phe Ala Ala Thr Leu Gly Gly Ala Val Leu Ile Pro Gly Ala Ala		
420	425	430
Leu Gly Gln Ile Leu Gly Gly Val Leu Val Ser Lys Phe Lys Met Lys		
435	440	445
Cys Lys Asn Thr Met Lys Phe Ala Leu Cys Thr Ser Gly Val Ala Leu		
450	455	460
Met Leu Ser Phe Val Phe Ile Tyr Ala Lys Cys Glu Asn Gly Pro Phe		
465	470	475
Ala Gly Val Ser Glu Ser Tyr Asn Gly Thr Gly Glu Met Gly Asn Leu		
485	490	495
Thr Ala Pro Cys Asn Ala Asn Cys Asn Cys Leu Arg Ser Tyr Tyr Tyr		
500	505	510
Pro Leu Cys Gly Ser Asp Gly Val Gln Tyr Phe Ser Pro Cys Phe Ala		
515	520	525
Gly Cys Leu Asn Ser Val Ser Asn Arg Lys Pro Lys Ala Tyr Tyr Asn		
530	535	540
Cys Ser Cys Ile Glu Arg Lys Val Asp Ile Thr Ser Thr Ala Glu Ser		
545	550	555
Pro Asp Phe Glu Ala Arg Ala Gly Lys Cys Lys Thr Gln Cys Ser Asn		
565	570	575
Leu Pro Ile Phe Leu Gly Ile Phe Phe Ile Thr Val Ile Phe Thr Phe		
580	585	590
Met Ala Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ile Leu Arg Cys Val Asn His		
595	600	605
Arg Gln Arg Ser Leu Ala Leu Gly Val Gln Phe Met Leu Leu Arg Leu		
610	615	620
Leu Gly Thr Ile Pro Gly Pro Ile Ile Phe Gly Val Thr Ile Asp Ser		
625	630	635
		640



Thr Cys Val Leu Trp Asp Ile Asn Glu Cys Gly Thr Lys Gly Ala Cys

645

650

655

Trp Ile Tyr Asp Asn Ile Arg Met Ala His Met Leu Val Ala Ile Ser

660

665

670

Val Thr Cys Lys Val Ile Thr Ile Phe Phe Asn Gly Leu Ala Ile Val

675

680

685

Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Pro Gly Thr Glu Val Ser Phe Gln Ser Gln

690

695

700

Asn Val Val Val Ser Thr Ile Thr Val Glu Glu Asp Leu Asn Lys Ile

705

710

715

720

Glu Asn Glu Gly

<210> 55

<211> 2172

<212> DNA

<213> Rat

<400> 55

aigcaggggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgicc cticcagccc agacacccca	60
cgccgtgcgt ctgcgtgcc ttcccagggtg gaggctcttg ctgtggcctc caggaatcag	120
aatgggggtt cgcaacctcg ggattctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctcct	180
ccctcttcga ctctccagc ttctgatgag ccgccggggt cacagctaag agagcttgag	240
gagggacctt gcgggiggag gaacttccac cccagtgic ttcagcgctg caacaacccc	300
aaaggttttc tgccttacta ctgtctctta gccctaacgc aaggatttgt agtaaatggc	360
ctagtaaata ttagcatttc caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag ttccctgacc	420
ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgtctctgtt tgtgtctttc	480
tttggtgaga gaggacacaa acctcgctgg ctlgcccttg catcctttat gatcggactg	540
ggagcgctgg tgttttcttt accacacttc ttcagtggga gatatgaact gggaaccatt	600
ttcgaagata cctgcctaac aaggaacagc accagatgtg ctcttcaac ctctctgctt	660
tctaactact tctatgtctt tgtccctggga caactgttgc tggggactgg aggaactccg	720

cctctacacc tgggaacggc cticattgat gactctgtac ccacacacaa atcttctcia 780  
tataatcggtat ttggctatct tatgtcaatc ctaggcccag ccattggcta tgtgttggga 840  
ggacagctgt tgacaatgia cattgatgtt gctatgggac aaagttcaga tctgactgag 900  
galgatcccc ggtggttggg ggcttgggtg attggattcc ttttagcttg gctctttgct 960  
tggcttttga taatgccttt ctccgttttt ccaagcatt taccagggac agcaaaaatt 1020  
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctcccttcca acatatggat 1080  
gaaaattttg ggaaaagtat taaagatttt ccaactgctg tgaagaattt gatgaggaat 1140  
acagtcttta tatgtttagt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt 1200  
gccacgtttt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctttgcggca 1260  
acacttggag gggctgtttt aattccctgga gctgccttg gicaaatctt aggttgggtt 1320  
cttgtttcaa aattcaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct 1380  
ggagtagcac ttatgctgag ttttgtattt atttatgcaa aatgtgaaaa tgggccattt 1440  
gctgggtgtgt ctgaatcata taatggaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcacctgac 1500  
aatgccaatt gcaattgttt gagatcctat tattaccgc tctgtggaag tgatggagtc 1560  
cagtattttt ctccctgctt tgcaggttgt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaaag 1620  
gcatattata attgttccctg tattgaaagg aaagtcgaca tcacttctac tgcagaaagc 1680  
cctgattttg aagcaagggc tggaaaatgt aaaactcagt gtcaaacct gccatattt 1740  
ctcggcactt tcttcatcac tgtgattttt accttattgg caggtacccc cataactgtg 1800  
tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg 1860  
cttcttcggt tgttaggcac gataacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc 1920  
acgtgtgttc tgtgggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctaigat 1980  
aacatcagga tggcgcatat gctgggtggc ataagtgtta ctgttaaagt catcaccata 2040  
ttcttcaatg gacttgcgat agttctctat aaaccaccgc cccaggaac ggaggtatca 2100  
tttcaaagtc agaatgtagt tgtgtcgacg attacagtgg aggaggacct caacaaaata 2160  
gagaacgaag ga 2172

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 56

tcaactgagc catccccgcc ttctt

25

<210> 57

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 57

tctgttcctg ggggcggtgg tttat

25

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 58

gacacaaaca gagacaacac gcaaaaggag

30

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 59

acaaacagag acaacacgca aaaggagatg

30

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 60

atcggactgg gagcgctggg gtttt

25

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 61

tattattacc cactctgtgg aagtgatgga

30

<210> 62

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 62

ctttcttgac catgcagggt tccaag

26

<210> 63

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 63

atcctcttct ttctcatcct tcgttc

26

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 64

atgcagggtt ccaagggagt cgagaac

27

<210> 65

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 65

tcatccttcg ttctctatct tgttgagg

28

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 66

taatacgact cactataggg

20

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

catacgattt aggtgacact atag

24

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 68

atcgagaagc gctatgaaat gaaga

25

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

agcgctccca gtccgatc

18

<210> 70

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

tttgggtgaga gaggacacaa acc

23

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 71

ggactgggag cgctgggtgtt ttctttac

28

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 72

cccaggggtgt agagcggagt t

21

<210> 73

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 73

tggtctttga taatgccttt ctcct

25

<210> 74

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 74

ctgctgtgaa gaatttgatg aggaa

25

<210> 75

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer



&lt;400&gt; 75

cagtgatgaa gaagatgccg agaaa

25

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Probe

&lt;400&gt; 76

cgctggcttg cctttgcac cttta

25

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 1931

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 77

tcaactgagc catctctccc ttcttcgact ctcccagctt ctgatgagcc gccgggglica	60
cagctaagcg agcttgagga gggacccttg gggiggagga acttccaccc ccagtgcttt	120
cagcgctgca acaaccccaa aggtttctg cttcacact gtctcttagc cctaacgcaa	180
ggatattgtag taaatggcct agtaaataat agcatttcca ccatcgagaa gcgctatgaa	240
atgaagagtt ccttgaccgg cctgatatca tggagctacg acatctcctt ttgcgtgttg	300
tctctgtttg tgtctttctt tggtagaga ggacacaaac ctgcctggct tgcctttgca	360
tcttttatga tggactggg agcgctggg tttctttac cacacttctt cagtgggaga	420
tatgaactgg gaaccatttt cgaagatacc tgcctaaca ggaacagcac cagatgtgct	480
tcttcaacct ctctgcttcc taactacttc tatgtctttg tccgggaca actgttgctg	540
gggactggag gaactccgct ctacaccccg ggaacggcct tcattgatga ctctgtaccc	600
acacacaaat ctctctata tatcggtatt ggctattcta tgtcaatcct aggcccagcc	660
attggctatg tgttgggagg acagctgttg acaatgtaca ttgatgttgc tatgggacaa	720

agttcagatc tgactgagga tgaiccccggt tgggtggggg ctltgggtgat tggatticctt 780  
 ttagcttggc tctttgcttg gtccttgata atgcctttct cctgttttcc aaagcattta 840  
 ccagggacag caaaaaattca agctggcaaa acttcccaga ctcatcaaaa taatagtact 900  
 tccttccaac atatggatga aaattttggg aaaagtatta aagattttcc aactgccttg 960  
 aagaatttga tgaggaatac agtctttata tgtttagtac tatcaactac ttctgaagca 1020  
 ctagttaacca cgggatttgc cacgttttta cctaaattta tagaaaatca atttggattg 1080  
 acatcgagca ttgcggcaac acttggaggg gctgttttaa ttccctggagc tgccttgggt 1140  
 caaatcttag gtgggtgtct tgtttcaaaa ttcaaaatga agtgtaaaaa tacaatgaag 1200  
 ttltgcgttat gtacatctgg agtagcactt atgcctagatt ttgtatttat ttatgcaaaa 1260  
 tgtgaaaatg ggccatttgc tgggtgtgtc gaatcatata atggaacagg agagatgggg 1320  
 aatctgactg caccctgcaa tgccaattgc aattgtttga gatcctatta ttaccactc 1380  
 tgtggaagtg atggagtcca gtatttttct ccttgccttg caggttgttt aaactcagtt 1440  
 tcaaacagga aaccaaaggc atattataat tgttccctga ttgaaaggaa agtcgacatc 1500  
 acttctactg cagaaagccc tgattttgaa gcaagggctg gaaaatgtaa aactcagtgt 1560  
 tcaaacctgc ccatatttct cggcatcttc tcatcacctg tgatttttac ctttatggca 1620  
 ggtaccccca taactgtgtc catattaagg tgtgtcaatc acagacagcg atctctagca 1680  
 ctgggagtgc agttcatgct tcttcgggtg ttaggcacga tacttgggcc aattatattt 1740  
 ggctgcacaa tagacagcac gtgtgttctg tgggacatca atgaatgtgg aacaaagggg 1800  
 gcgtgttggg tctatgataa catcaggatg gcgcatatgc tgggtggctat aagtgttact 1860  
 tgtaaagtca tcaccatatt ctccaatgga ctltcgatag ttctctataa accaccgccc 1920  
 ccaggaacgg a 1931

<210> 78

<211> 484

<212> DNA

<213> Rat

<400> 78

ctttcttgac catgcagggt tccaagggag tcgagaaccc ggcatctgtc ccttccagcc 60  
 cagacacccc acgccgtgcg tctgcgtcgc ctltccaggt ggaggtctct gctgtggcct 120

ccaggaatca gaatgggggt tgcgaacctc gggaatctga agatccccag aagicaactg 180  
 agccatctcc tccttcttcg actctcccag ctctgataga gccgccgggg tcacagctaa 240  
 gcgagcttga ggagggacct tgcgggtgga ggaacttcca cccccagtgt cticagcgct 300  
 gcaaacaacc caaaggtttt ctgcttcaact actgtctctt agccctaacg caaggtattg 360  
 tagtaaatgg cctagtaaat attagcattt ccacatcga gaagcgctat gaaatgaaga 420  
 gtccctgac cggcctgata tcatcgagct acgacatctc cttttgcgtg ttgtctctgt 480  
 ttgt 484

<210> 79

<211> 704

<212> DNA

<213> Rat

<400> 79

tattattacc cactctgigg aagtgaatga gtccagtatt tttctccctg ctttgcaggt 60  
 tgtttaaact cagtttcaaa caggaaacca aaggcatatt ataattgttc ctgtattgaa 120  
 aggaaagtcg acatcacttc tactgcagaa agccctgatt ttgaagcaag ggctggaaaa 180  
 tgtaaaactc agtgttcaaa cctgcccata tttctcggca tcttcttcat cactgtgatt 240  
 ttaccttta tggcaggtaac ccccataact gtgtccatat taagggtgtg caatcacaga 300  
 cagcgatctc tagcactggg agtgcagttc atgcttcttc ggttggttagg cacgatacct 360  
 gggccaatta tatttggcgt cacaatagac agcacgtgtg tttgttgga catcaatgaa 420  
 tgtggaacaa agggggcggt tggatctat gataacatca ggatggcgca tatgtgtgtg 480  
 gctataagtg ttacttgtaa agtcatcacc atattcttca atggacttgc gatagtctc 540  
 tataaaccac cgccccagg aacggaggta tcatlcaaa gtcagaatgt agttgtgtcg 600  
 acgattacag tggaggagga cctcaacaaa atagagaacg aaggatgaga aagaagagga 660  
 tactgcctta gaaaagtggc tccttctgt cagaacaaac tgtg 704

<210> 80

<211> 2175

<212> DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 80

atgcagggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgtec cticcagccc agacacccca 60  
cgccgigcgt ctgcgtcgcc tccccagggtg gaggctctctg ctgtggccctc caggaatcag 120  
aatgggggtt cgcaacctcg ggaatctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctcct 180  
ccttcttcga ctctcccagc ttctgatgag ccgccggggt cacagctaag cgagcttgag 240  
gagggacctt gcgggtggag gaacttccac cccagtgic ttcagcgctg caacaacccc 300  
aaaggttttc tgccttacta ctgtctctta gccctaacgc aaggtattgt agtaaattggc 360  
ctagtaataa ttagcatctt caccatcgag aagcgctatg aaatgaagag tccccgacc 420  
ggcctgatat catcgagcta cgacatctcc ttttgcgtgt tgcctctgtt tgtgtctttc 480  
tttggtaga gaggacacaa acctcgctgg ctggcctttg catcctttat gatcggactg 540  
ggagcgctgg tgttttcttt accacattc ttcagtggga gatatgaact gggaaccatt 600  
ttcgaagata cctgcttaac aaggaacagc accagatgig ctcttcaac ctctctgctt 660  
tctaactact tctatgtctt tgtccctggga caactgttgc tggggactgg aggaactccg 720  
ctctacaccc tgggaacggc ctcatctgat gactctgtac ccacacacaa atcttctcta 780  
tataatcggtt ttggctattc tatgtcaatc ctaggcccag ccattggcta tgtgttggga 840  
ggacagctgt tgacaatgta cattgatgtt gctatgggac aaagttcaga tctgactgag 900  
gatgatcccc ggtgggttggg ggcttgggtg attggattcc ttttagcttg gctctttgct 960  
tggcttttga taaigccttt ctccgtttt ccaaagcatt taccaggac agcaaaaatt 1020  
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctcccttcca acatalggat 1080  
gaaaattttg ggaaaagtat taaagatttt ccaactgctg tgaagaattt gatgaggaat 1140  
acagtcttta tatgtttagt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt 1200  
gccacgtttt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag cattgcggca 1260  
acacttggag gggctgtttt aattccctgga gctgctcttg gtcaaatctt aggttgggtt 1320  
cttgtttcaa aattcaaaaat gaagtglaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct 1380  
ggagtagcac ttaigctgag ttttgtattt attatgcaa aatgtgaaaa tgggccattt 1440  
gctgggtgtg ctgaatcata taatggaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcaccttgc 1500  
aatgccaat gcaattgttt gagatcctat tattaccac tctgttgaag tgaatggagtc 1560  
cagtattttt ctccctgctt tgcaggttgt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaaag 1620

gcatattata attgttccig tattgaaagg aaagtcgaca tcacttctac tgcagaaaagc 1680  
 cctgattttg aagcaagggc tggaaaatgt aaaactcagt gticaaacct gcccatattt 1740  
 ctccggcatct tcttcatcac tgtgattttt acctttatgg caggtacccc cataactgtg 1800  
 tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcattg 1860  
 ctcttccggt tgttaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc 1920  
 acgtgtgttc tgtgggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctatgat 1980  
 aacatcagga tggcgcatat gctgggtggct ataagtgtta ctgttaaagt catcaccata 2040  
 ttcttcaatg gacttgcgat agttctctat aaaccaccgc ccccaggaac ggaggtaica 2100  
 tticaaagtc agaatgtagt tgtgtcgacg attacagtgg aggaggacct caacaaaata 2160  
 gagaacgaag gatga 2175

<210> 81

<211> 2175

<212> DNA

<213> Rat

<400> 81

atgcagggtt ccaagggagt cgagaacccg gcattcgicc ctccagccc agacacccca 60  
 cgccgtgcgt ctgcgtcgcc ttcccaggig gaggctctctg ctgiggcctc caggaatcag 120  
 aatgggggtt cgcaacctcg ggattctgaa gatccccaga agtcaactga gccatctcct 180  
 ccttcttcga ctctcccagc ttctgatgag ccgccggggt cacagctaag agagcttgag 240  
 gagggacctt gcgggtggag gaacttccac cccagtgtc ttcagcgtc caacaacccc 300  
 aaaggttttc tgccttacta ctgtctctta gccctaacgc aaggtattgt agtaaatggc 360  
 ctagtaata ttagcatttc caccatcgag aagcgctatg aatgaagag ttccctgacc 420  
 ggcttgatat catcgagcta cgacatctcc ttltgcgtgt tgtctctgtt tgtgtctttc 480  
 ttgtgtgaga gaggacacaa acctcgctgg ctgtcctttg catcctttat gatcggactg 540  
 ggagcgttgg tgttttcttt accacacttc ttcagtggga gatatgaact gggaaccatt 600  
 ttccaagata cctgcttaac aaggaacagc accagatgtg ctctttcaac ctctctgctt 660  
 tctaactact tctaigtctt tgtccigggg caactgttgc tggggactgg aggaactccg 720  
 ctctacaccc tgggaacggc ctccatgat gactctgtac ccacacacaa atcttctcta 780

tatatcggtta ttggctattc tatgtcaatc ctaggcccag ccattggcta tgtgttggga 840  
ggacagctgt tgacaatgta cattgatgtt gctatgggac aaagttcaga tctgactgag 900  
gatgatcccc ggtggttggg ggcttgggtg attggattcc ttttagcttg gctctttgct 960  
tggcttttga taatgccttt ctccctgtttt ccaaagcatt taccagggac agcaaaaaatt 1020  
caagctggca aaacttccca gactcatcaa aataatagta ctctcttcca acatatggat 1080  
gaaaattttg ggaaaagtat taaagatttt ccaactgctg tgaagaattt gatgaggaat 1140  
acagctttta tatgtttagt tctatcaact acttctgaag cactagttac cacgggattt 1200  
gccacgtttt tacctaaatt tatagaaaat caatttggat tgacatcgag ctttgcggca 1260  
acacttggag gggctgtttt aattccttga gctgctcttg gtcaaatctt aggtgggtgtt 1320  
cttgtttcaa aattcaaaat gaagtgtaaa aatacaatga agtttgcgtt atgtacatct 1380  
ggagtagcac ttatgctgag ttttgtattt atttatgcaa aatgtgaaaa tgggccattt 1440  
gctgggtgtg ctgaatcata taatggaaca ggagagatgg ggaatctgac tgcaccttgc 1500  
aatgccaatt gcaattgttt gagatcctat tattaccgc tctgtggaag tgatggagtc 1560  
cagtatTTTT ctccctgctt tgcaggttgt ttaaactcag ttcaaacag gaaaccaaag 1620  
gcatattata attgttccctg tattgaaagg aaagtcgaca tcacttctac tgcagaaagc 1680  
cctgatTTTT aagcaagggc tggaaaatgt aaaactcagt gtcaaacct gcccatattt 1740  
ctcggcactt tcttcatcac tgtgatTTTT acctttatgg caggtacccc cataactgtg 1800  
tccatattaa ggtgtgtcaa tcacagacag cgatctctag cactgggagt gcagttcatg 1860  
cttcttcggt tgttaggcac gatacctggg ccaattatat ttggcgtcac aatagacagc 1920  
acgtgtgttc tgtgggacat caatgaatgt ggaacaaagg gggcgtgttg gatctatgat 1980  
aacaicagga tggcgcatat gctgggtggc ataagtgtta cttgttaaagt catcaccata 2040  
ttcttcaatg gacttgcgat agtctctat aaaccaccgc cccaggaac ggaggtaatca 2100  
tttcaaagtc agaatgtagt tgtgtcgacg attacagtgg aggaggacct caacaaaata 2160  
gagaacgaag gatga 2175

<210> 82

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 82

atcgataatga agagcgccaa aggtattgag

30

<210> 83

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 83

actagttcac ccttctttta ctattttgtt

30

<210> 84

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 84

tagaaggcac agtcgagg

18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02564

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17,  
A61K39/395, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/68, C12P21/02,  
C12P21/08//(C12N15/12, C12R1:19)/(C12N5/10, C12R1:91),

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N1/00-15/90, C07K14/00-16/46, A61K31/00-48/00,  
G01N33/00-98, C12Q1/00-70, C12P21/00-08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/54477 A1 (HYSEQ INC.), 02 August, 2001 (02.08.01), (Family: none)	1-13, 17, 20
P, A	OKAZAKI Y. et al., "Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60, 770 full-length cDNAs.", Nature, 05 December, 2002 (05.12.02), Vol.420, No.6915, pages 563 to 573	1-13, 17, 20
A	KONDO S. et al., "Computational analysis of full- length mouse cDNAs compared with human genome sequences.", Mamm Genome, (2001), Vol.12, No.9, pages 673 to 677	1-13, 17, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not  
considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing  
date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means  
"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
28 March, 2003 (28.03.03)

Date of mailing of the international search report  
08 April, 2003 (08.04.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02564

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAYASHIZAKI Y., "Computer-based methods for the mouse full-length cDNA encyclopedia: real-time sequence clustering for construction of a nonredundant cDNA library." Genome Res., (2001), Vol.11, No.2, pages 281 to 289	1-13,17,20
A	KUSUHARA H. et al., "Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney", J.Control Release, 17 January, 2002 (17.01.02), Vol.78, Nos.1 to 3, pages 43 to 54	14-16,18,19, 21-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02564

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> (C12P21/02, C12R1:91), (C12P21/08, C12R1:91)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, A61K39/395, G01N33/50, G01N33/15, C12Q 1/68, C12P21/02, C12P21/08 // (C12N15/12, C12R1:19)/(C12N5/10, C12R1:91), (C12P21/02, C12R1:91), (C12P21/08, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N1/00~15/90, C07K14/00~16/46, A61K31/00~48/00, G01N33/00~98, C12Q 1/00~70, C12P21/00~08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/54477 A1 (HYSEQ INC.) 2001. 08. 02 (ファミリーなし)	1-13、 17, 20
PA	Okazaki Y. et al., "Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs.", Nature, (2002. 12. 05), Vol. 420, No. 6915, p. 563-573	1-13、 17, 20
A	Kondo S. et al., "Computational analysis of full-length mouse cDNAs compared with human genome sequences.", Mamm Genome, (2001), Vol. 12, No. 9, p. 673-677	1-13、 17, 20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 03. 03

国際調査報告の発送日

08.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美



4 B

8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hayashizaki Y., " Computer-based methods for the mouse full-length cDNA encyclopedia: real-time sequence clustering for construction of a nonredundant cDNA library." Genome Res., (2001), Vol. 11, No. 2, p. 281-289	1 - 1 3、 1 7, 2 0
A	Kusuhara H., et al., " Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney" J. Control Release, (2002, 01. 17), Vol. 78, No. 1-3, p. 43-54	1 4 - 1 6, 1 8, 1 9, 2 1 - 3 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**